Biomechanisch-rheologisches Verhalten hyalinen Knorpels unter in vitro Einwirkung verschiedener Elektrolyte und Enzyme

PETER HUPE

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0043

" Biomechanisch-rheologisches Verhalten hyalinen Knorpels unter in vitro Einwirkung verschiedener Elektrolyte und Enzyme."

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Peter Hupe

Referent: Prof. Dr. med. G. Arnold

Korreferent: Prof. Dr. med. S. Hollmann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
Prof. Dr. med. M. Straßburg

Referent
Prof. Dr. med. G. Arnold
Korreferent
Prof. Dr. med. S. Hollmann

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Mechanische Eigenschaften des hyalinen Knorpels unter Druckbeanspruchungen	1
1.2	Bedeutung der Mucopolysaccharide als wesentlicher Bestandteil der Knorpelgrundsubstanz	6
2.	Das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels unter Einwirkung von NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen	10
2.1	Präparation der Knorpelprobestücke	10
2.2	Versuchsaufbau	12
2.3	Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf	14
2.4	Ergebnisse	16
2.5	Interpretation	17
3.	Die Wirkung von Calcium auf das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels	37
3.1	Calcium	37
3.2	Änderung der uniaxialen Deformation unter konstanter Belastung des hyalinen Knorpels nach zwischenzeitlicher Gabe einer 10%igen Calciumgluconat-Lösung	38
3.2.1	Präparation der Knorpelprobestücke	38
3.2.2	Versuchsaufbau	38
3.2.3	Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf	38
3.2.4	Ergebnisse	40

Seite

3.3 Änderung der uniaxialen Deformation unter konstanter Belastung des hyalinen Knorpels nach zwischenzeitlicher Gabe einer 0,9%igen Calciumchloridlösung 43

3.3.1 Präparation des Knorpels 43
3.3.2 Versuchsaufbau 43
3.3.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf 43
3.3.4 Ergebnisse 45

3.4 Wie ändert sich die Spannung des hyalinen Knorpels unter konstanter Kompression nach zwischenzeitlicher Gabe einer 0,9%igen bzw. 9 % Calciumchloridlösung? 47

3.4.1 Präparation des Knorpels 47
3.4.2 Versuchsaufbau 47
3.4.3 Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf 47
3.4.4 Ergebnisse 50

3.5 Wie verhält sich unter isometrischen Bedingungen die Knorpelspannung nach zwischenzeitlichen Milieuänderungen? 51

3.5.1 Präparation des Knorpels 51
3.5.2 Versuchsaufbau 51
3.5.3 Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf 51
3.5.4 Ergebnisse 53
3.5.5 Interpretation 56

4. Die Wirkung von Elastase auf den hyalinen Knorpel 58

4.1 Elastase 58

4.2 Präparation der Enzymlösung 59

4.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels 60

		Seite
4.4	Ergebnisse	69
4.5	Interpretation	70
5.	Die Wirkung von Hyaluronidase auf den hyalinen Knorpel	71
5.1	Hyaluronidase	71
5.2	Präparation der Enzymlösung	73
5.3	Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf	74
5.4	Ergebnisse	82
5.5	Interpretation	84
6.	Diskussion	86
7.	Anhang	92
7.1	Symbole, Bezeichnungen und Definitionen	92
7.2	Viscoelastisches Verhalten, Kriechen (creep modul), Relaxation	93
8.	Literaturverzeichnis	95
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Mechanische Eigenschaften des hyalinen Knorpels unter Druckbeanspruchungen

Aufbau, systematische Einordnung und Funktion des Knorpels als Bestandteil der Binde- und Stützgewebe sind seit langem bekannt. Der hyaline Knorpel enthält einen feinen Faserfilz aus Kollagen, der mit dem Polarisationsmikroskop bei starker Vergrößerung zu sehen ist. In der Elektronenmikroskopie werden diese feinen Faserstrukturen als kollagene Mikrofibrillen bezeichnet (MERKER, 1978). Biochemisch und immunhistochemisch handelt es sich beim hyalinen Knorpel um Typ II Kollagen. Dabei ist zu beachten, daß das Perichondrium aus gewöhnlichem Typ I Kollagen besteht. Für die mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels sind die kollagenen Mikrofibrillen von erheblicher Bedeutung. Feingeweblich sind sie je nach Beanspruchung und Lokalisation in bestimmten Vorzugsrichtungen orientiert. Am mechanisch-rheologischen Verhalten des Knorpels ist die Grundsubstanz beteiligt. Sie steht mit den kollagenen Mikrofibrillen in Form eines komplexen physiko-chemischen Systems in Beziehung (HOFFMANN und MASHBURN, 1970).

Bei biomechanischen Beanspruchungen spielt auch das aus Typ I Kollagen bestehende Perichondrium eine nicht zu unterschätzende Rolle. Wird der Knorpel uniaxial zusammengedrückt, so ist eine jeweilige Querdilatation die Folge. Ihr wirken

die kollagenen Fasern des Perichondriums entgegen. Die sogenannte Kraftrückgewinnerscheinung dieser Fasern - auch als mechanische Erholungserscheinung bezeichnet - dürfte an der uniaxialen Wiederausdehnung des Knorpels nach teilweiser oder vollständiger Entlastung beteiligt sein. Dabei ist zu beachten, daß die mechanischen Vorgänge am Knorpel und anderen Geweben viscoelastisch und damit zeit- bzw. geschwindigkeitsabhängig sind (ARNOLD et al., 1976; ARNOLD und HARTUNG, 1974). Da die vorgelegten Untersuchungen an statistischen Reihen auszuwerten waren, mußte eine geometrische Normierung eingehalten werden. Daher haben wir die Knorpelzylinder ohne Perichondrium untersucht. Daher sind die an diesen Proben gewonnenen Ergebnisse untereinander vergleichbar.

Die Knorpel der meisten Gelenke sind hyalin. Sowohl dieser hyaline Gelenkknorpel als auch der an einigen Stellen vorkommende Faserknorpel in Gelenken können sich in verschiedener Weise pathologisch verändern (MORRISON, 1970). In den letzten zehn bis fünfzehn Jahren ist eine gravierende Zunahme der degenerativen Gelenkserkrankungen in der Praxis zu sehen. Somit ist ihre Behandlung eine wichtige Aufgabe für den Arzt für Allgemeinmedizin, Orthopädie, Unfallchirurgie und Rheumatologie. Es ist nicht zu verkennen, daß trotz aller Fortschritte der konservativen und operativen Maßnahmen problematische Verlaufsformen zu beobachten sind. Daher halten wir weitere intensive Bemühungen zur Erforschung des gesunden und pathologisch veränderten Knorpels für eine

wesentliche Aufgabe.

Eine praktische Bedeutung hat die sogenannte rheumatoide Arthritis. Als Folgeerscheinungen entwickeln sich nicht selten Knorpeldegenerationen (IDELBERGER, 1978). Während eine Reihe von Arzneimitteln entwickelt wurden, die zwar die Krankheitssymptome herabzusetzen und die Progredienz zu verzögern vermögen, ist die Ätiologie nur teilweise bekannt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß der Knorpel neben der Krebs- und Hypertonieforschung jahrelang "Stiefkind" war, wie es namenhafte Autoren in führenden Fachzeitschriften zum Ausdruck bringen.

Zum feingeweblichen Aufbau und zur Pathohistologie des Knorpels gibt es zahlreiche Befunde (HARTMANN und FRICKE, 1957). Diese wurden in den letzten Jahren aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen wesentlich ergänzt (BARGMANN, 1977; HILDEBRANDT et al., 1972; SOKOLOFF, 1969). Ober den biomechanischen Aufbau und den Stoffwechsel des hyalinen Knorpels ist in letzter Zeit aufgrund neuer Ergebnisse von MUIR (1977) berichtet worden (KEMPSON, 1973; KEMPSON et al., 1971). Die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels wurden mit verfeinerten Methoden von ARNOLD et al. (1978) untersucht. Dabei hat es sich gezeigt, daß die Knorpelmechanik mit den klassischen Methoden der Physik und konventionellen Verfahren der Biomechanik in ihrer gesamten Komplexität nicht ausreichend erfaßt werden kann. Dagegen lassen sich mit modi-

fizierten Ansätzen der theoretischen und experimentellen Rheologie Teilgebiete der modernen Physik in Anwendung auf die Histomechanik biologischer Gewebe wesentliche mechanische Eigenschaften des Knorpels darstellen (ELMORE et al., 1963; ZAREK und EDWARDS, 1965; SOKOLOFF, 1966; HAYES und MOCKROS, 1971; KEMPSON, 1971; WALKER und HAJEK, 1972; ARNOLD und HARTUNG, 1973; ARNOLD und HARTUNG, 1974; HARTUNG et al., 1975; ARNOLD et al., 1976). Dabei stellte sich heraus, daß der Knorpel ein komplexes physiko-chemisches System verkörpert. Der Knorpel ist nach gegenwärtigem Stand unserer Kenntnisse im Sinne der Histomechanik als anisotropes Gewebe mit nichtlinear thermo-viscoelastischen Eigenschaften aufzufassen. Es erschien uns naheliegend anzunehmen, daß dieses mechanische Verhalten des Knorpels in empfindlicher Wechselwirkung zu Enzymen und Elektrolyten steht. Aus diesen Überlegungen ergab sich die Problemstellung zu der vorliegenden Arbeit.

In einer Abhandlung über das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels unter statischen und dynamischen Belastungen unterschieden ARNOLD et al. (1975) drei historheologische Phasen.

I. Mechanische Vorgeschichte
(Spannungs-Dehnungs-Vorgeschichte)

II. Transienter Vorgang
(Übergangsverhalten, transienter Prozess)

III. Gleichmaßverhalten
(Viscoelastischer Gleichgewichtszustand, steady state, stationärer Zustand, eingeschwungener Zustand bei dynamischen Prozessen)

Sowohl Temperaturänderungen als auch Veränderungen der Kraft und Kompressionsgeschwindigkeit können diese drei Phasen wesentlich beeinflussen und führen zu sehr verschiedenen Meßergebnissen.

Bei allen biomechanischen Untersuchungen am Knorpel sind folgende Faktoren zu berücksichtigen:
Entnahmestelle, Beziehung zum Perichondrium, räumliche Orientierung der Probestücke, Untersuchungsmethode, Beanspruchungsrichtung, Milieu, Temperatur, mechanische Vorgeschichte (stress-strain history) und rheologischer Zustand.

In der folgenden Versuchsserie soll dargelegt werden, wie sich das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels unter Einwirkung von hypo-, iso- und hypertonen Natriumchloridlösungen ändert. Zuvor jedoch erscheint es notwendig, auf die Funktion und die ionalen Verhältnisse der Mucopolysaccharide - sie sind wesentlicher Bestandteil der Knorpelgrundsubstanz - einzugehen.

1.2 Bedeutung der Mucopolysaccharide als wesentlicher Bestandteil der Knorpelgrundsubstanz

Die Mucopolysaccharid-Proteine werden auch als Proteoglykane bezeichnet. Sie erfüllen innerhalb des Stoffwechsels drei wichtige Aufgaben:

1. Als Träger anionischer Ladungen (negative fixed charge) vermögen sie Kationen zu binden, insbesondere Ca-Ionen (MAROUDAS, 1975). Zudem bewirkt die gleichsinnige Ladung gegenseitige Abstoßung, wodurch ihre Solvatisation begünstigt wird. Physiologischerweise ist die intrazelluläre Ionenkonzentration höher als die extrazelluläre. Schon eine geringe Elektrolytverschiebung würde zu einer Zustandsänderung dieser Makromoleküle führen.

2. Da Knorpel größtenteils aus Wasser besteht, liegt die besondere Funktion der Mucopolysaccharid-Proteine in der Bindung extrazellulärer Flüssigkeit.

3. Die Proteoglykane sind ferner von einem dichten Faserfilz kollagener Mikrofibrillen vom Typ II Kollagen umflochten. Dieser makromolekulare Komplex bildet eine Schranke, die das Interstitium vor der Diffusion fremder Moleküle schützt (BUDDECKE, 1978).

Eine Störung des enzymatischen Auf- und Abbaues dieser hochmolekularen Verbindungen, die im Bindegewebssystem überall präsent sind, führt zu folgenschweren Krankheitsbildern (Mucopolysaccharidspeicherkrankheiten Typ I-VI; BUDDECKE, 1978).

Eine Beeinträchtigung des Knorpels in einem der drei oben genannten Punkte bedingt Änderungen seines mechanisch-rheologischen Verhaltens. Im Gegensatz zur konventionellen Histologie und Elektronenmikroskopie (MOW, 1974) sowie der Histochemie lassen sich mit den von uns weiterentwickelten biomechanischen Methoden (Historheologie, Histomechanochemie) fortlaufende Untersuchungen ausführen. Dabei lassen sich Reversibilität und Reproduzierbarkeit verhältnismäßig leicht überprüfen. Eine fortlaufende Registrierung der wichtigsten Kenngrößen wie z.B. Druckkraft, uniaxiale Stauchung (Zusammendrückung, einachsige Verformung), Temperatur, pH-Wert, elektrischer Widerstand der Lösungen (Resistometrie) und in Form synchroner über die Zeit geschriebener Kurven mit Hilfe eines Mehrkanalkompensationsschreibers vermittelt eine schnelle Übersicht. Zusammenhänge zwischen Ursachen und Wirkungen (input functions, output functions) sind vordergründig leicht zu erkennen.

Die anteilsmäßige Verteilung der sauren Mucopolysaccharide ist innerhalb der einzelnen Bindegewebsarten verschieden.

Neben Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat kommt der Hyaluronsäure eine erhebliche Bedeutung zu.

Wie schon erwähnt sind die Mucopolysaccharide-Proteinkomplexe Träger anionischer Ladungen. Durch die gleichsinnige Polarisation stoßen sie sich einerseits ab, wodurch ihre Solvatisation begünstigt wird, andererseits sind sie befähigt Kationen insbesondere Na- und Ca-Ionen zu binden.

Neben der selektiven Ionenverteilung durch aktiven Transport als Leistung der lebenden, stoffwechselaktiven Zelle finden wir mengenmäßig eine hohe Anreicherung von Ca-Kationen in Nasen- und Ohrknorpel (BUDDECKE, 1977). Der hohe Gehalt an Chondroitinsulfat vermag dort die ca. zwanzigfache Menge Calcium zu binden verglichen mit der Kapazität des Blutplasmas. Hier erfolgte die ionale Verteilung durch Komplexbildung.

Bereits 1963 wies SOKOLOFF in einer experimentellen Studie darauf hin, daß die anionischen Gruppen wesentlich an der physiologischen Leistung des Knorpels beteiligt sind. Er fand heraus, daß in erster Linie die Sulfat- und Carboxylgruppen der Matrixmucopolysaccharide und Proteine die Träger anionischer Ladungen sind. In Kompressionsversuchen am hyalinen Knorpel führte er die gesteigerte Deformation unter Belastung darauf zurück, daß durch verschiedene dem

Knorpel zugeführte Kationen die Ladung herabgesetzt und dadurch der Zusammenhang der kolloidalen Aggregate reduziert wird. Dieses hat eine gesteigerte Wasserverdrängung zur Folge, welche letzten Endes Ursache für den Kraftrückgang im Knorpel ist. Ferner bewies er, daß die Affinität der zugeführten Kationen um so größer ist, je höher ihre Valenzen sind.

Untersuchungen von PHELPS und ATKINS (1974) sowie RICE (1961) und TANFORD (1966) ergaben, daß eine Carboxylgruppe am C_6-Atom einer Glukopyranstruktur verschiedene Affinitäten für das einfache und kleinste H^+-Ion hat, und daß beträchtliche Unterschiede bezüglich der energetischen Verhältnisse zwischen den einzelnen Polymeren existieren. Im weiteren Verlauf der Experimente legten sie dar, daß das Ausmaß der ionalen Verteilung lediglich von der Art des Polymers im Gewebe und von seiner Ladungsdichte, nicht aber von seiner Kettenlänge abhängt. Während die Ladungsdichte der Hyaluronsäure mit nur einer Carboxylgruppe pro Disaccharid relativ gering ist, wächst die des Heparins mit ihren sieben anionischen Ladungen pro Tetrasaccharid beträchtlich. Eine nicht unerhebliche Rolle spielen die Konzentrationen der einzelnen Mucopolysaccharide wie aus dem o.g. Beispiel des Ohr- und Nasenknorpels zu erkennen ist. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß einzelne Kationen Wechselwirkungen haben können, die nicht allein elektrostatischen Ursprungs sind, sondern deren Wirkungsmechanismus einer bisher noch ungeklärten Ursache zugrunde liegt.

2. Das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels unter Einwirkung von NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen

2.1 Präparation der Knorpelprobestücke

Aus dem Brustbein eines ca. 3 - 4 Monate alten Kalbes wurden für den Serienversuch mittels einer Bohrmaschine und eines Hohlbohrers in Rippennähe zwanzig zylinderförmige Knorpelstücke mit einem Durchmesser von 6,4 mm gestanzt. Mit einer speziell für diesen Zweck im Anatomischen Institut Düsseldorf entwickelten Schneidevorrichtung wurde das Untersuchungsgut auf eine Zylinderhöhe von 3,8 mm normiert. Besonders war darauf zu achten, daß die beiden Schnittebenen einen rechten Winkel mit der Längsachsenebene des Knorpelzylinders bildeten. Vor Austrocknung geschützt, wurden die noch nicht benötigten Versuchsproben bei einer Temperatur von -20°C gelagert (s. Abb. 1).

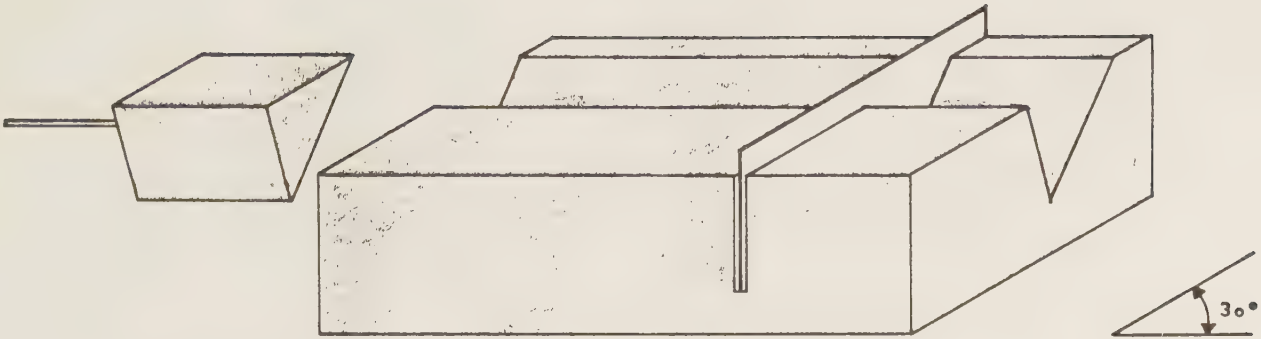

ABB. 1
SCHNEIDEVORRICHTUNG FÜR PRÄFORMIERTE KNORPELZYLINDER

2.2 Versuchsaufbau

Auf dem in vertikaler Richtung beweglichen Sockel der Versuchsapparatur war ein Becher mit einem Durchmesser von 3 cm und einer Höhe von 5 cm angebracht, in dem das Untersuchungsgut zuerst in einer isotonen Kochsalzlösung den Kompressionsbelastungen durch einen Stempel, der oberhalb der Becheröffnung starr mit einem Meßkopf befestigt war, ausgesetzt wurde. Es handelt sich um eine selbstgebaute Zusatzeinrichtung für die Universalprüfmaschine vom Typ U 1434 der Fa. Zwick & Co., Einsingen bei Ulm. Das Metallgefäß befand sich in einem Wasserbad mit einer Zu- und Ablaufvorrichtung. Während zwei Pumpen über Einstellventile für einen konstanten Wasserbadpegel sorgten, hielt ein Thermostat, welcher in dem Kreislauf integriert war, die Wassertemperatur auf konstant 37°C (s. Abb. 2). Elektronische induktive Fühlerlängenänderungsaufnehmer übertrugen nach jeweiliger Umschaltung von der Weg-Zeit- auf die Kraft-Zeit-Funktion die Daten auf einen Mehrkanalschreiber, der diese Analogsignale in Form einer graphischen Darstellung aufzeichnete.

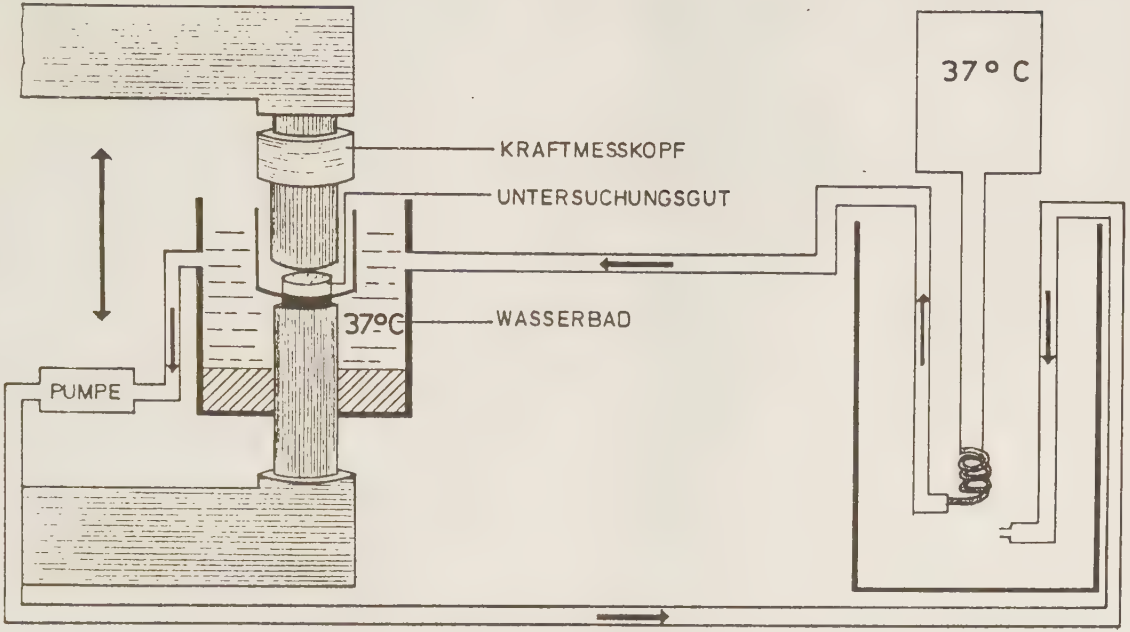

ABB. 2 SCHEMATISCHER AUSSCHNITT DER KOMPRESSIONSANLAGE MIT TEMPERIERTEM WASSERKREISLAUF

2.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf

Nachdem der Knorpel jeweils 10 mal vorbelastet worden war, wurde er nach einer fünfminütigen Erholungsphase in isotonischer Kochsalzlösung anfangs um 0,5 mm und dann infolge der Nullpunktverschiebung um 0,3 mm mit einer Geschwindigkeit von 1,5 mm/min. und einer Frequenz von 0,05 Hz zyklisch komprimiert. Die maximale Kraft war auf 20 N limitiert, und der Papiervorschub betrug 250 mm/h. Nach Eintritt des viscoelastischen Gleichgewichtszustandes (steady state) wurde nach fünfmaliger Aufzeichnung der Hystereseschleifen unter der jeweiligen NaCl-Konzentration die Lösung mit Hilfe eines dünnen Kathederschlauches vorsichtig abgesaugt und mit einer Spritze die frische Lösung in anderer Konzentration zugeführt. Dabei war zu beachten, daß der Spritzeninhalt ebenfalls eine Temperatur von 37°C hatte. Dieser Ablauf erfolgte mit 0,3 %, 1,5 %, 3,0 %, 6,0 %, 12 % und 24%igen NaCl-Lösungen insgesamt 20 mal (s. Abb. 3 und 4).

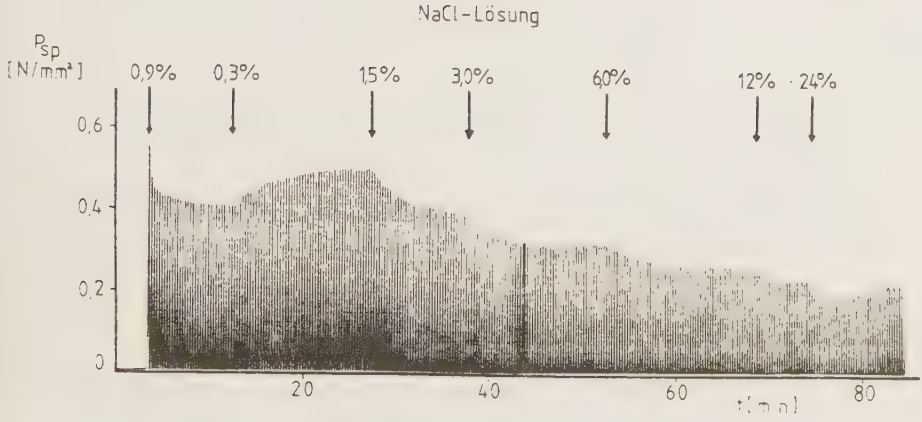

Abb. 3

Kompressionsdiagramm eines Knorpelzylinders aus dem Brustbein eines 3 - 4 Monate alten Kalbes unter variablen Elektrolytkonzentrationen. Der Durchmesser des Knorpelzylinders betrug 6,4 mm, seine Höhe 3,8 mm, die statische Verformungsgeschwindigkeit 1,5 mm/min und die Frequenz 0,05 Hz. Auf der Abszisse steht die Zeit t in Minuten , auf der Ordinate die Druckspannung P_{sp} in Newton. Der Knorpel wurde in der jeweiligen NaCl-Lösung vorher solange komprimiert, bis er sich im viscoelastischen Gleichgewichtszustand (steady state) befand.

2.4 Ergebnisse

Die Werte der Tabellen 1 - 10 zeigen, daß der Knorpel lediglich unter Belastung in hypotoner Kochsalzlösung mit einem mittleren Spannungsanstieg von 15,9 % reagiert, wenn die Kraft, die er in physiologischer NaCl-Lösung dem Druck entgegensetzt, als Bezugsgröße zugrunde gelegt wird. Bei allen anderen hypertonen Konzentrationen ist ein Spannungsverlust zu verzeichnen, der unter dem Einfluß einer gesättigten 24%igen Lösung bei 65,4 % liegt. Während die Widerstandskraft bei fünffacher Konzentrationserhöhung von 0,3 % auf 1,5 % um nur 21 % zurückgeht, nimmt sie schon bei einer nur doppelten Konzentrationssteigerung von 1,5 % auf 3,0 % um fast den gleichen Betrag ab. Unter Belastung in 24%iger Lösung zeigt sich in der graphischen Darstellung ein auffallender Befund. Anfangs sinken die Kraftspitzen schnell ab. Nach Durchlaufen des Minimums steigen sie wieder an. Das in Abb. 3 dargestellte Druckspannungsprofil wurde an 20 Knorpelprobestücken untersucht. Alle Probestücke zeigten ein qualitativ ähnliches Verhalten. Quantitativ bestanden zwischen den zwanzig untersuchten Knorpelstücken hinsichtlich der Druckspannungen bei verschiedenen Konzentrationen große Unterschiede, die aus den Zahlenangaben über empirische Varianz und Streuung in Tabelle 11 hervorgehen.

2.5 Interpretation

Aus den Untersuchungen über die Höhe der Druckspannungen unter konstanten einachsigen Verformungen bei verschiedenen Konzentrationen sind drei Fakten zu entnehmen:

1. Der Knorpel zeigt bei Konzentrationswechsel kein lineares Verhalten bezüglich seiner Spannungsänderung.

2. Seine Pufferkapazität ist im physiologischen Bereich am größten.

3. Die hohe empirische Varianz und Streuung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Knorpelstücke trotz Normierung bezüglich geometrisch gleicher Form, Größe und Entnahmerichtung unterschiedlich strukturiert sind hinsichtlich Verlauf, Anordnung und Menge der kollagenen Mikrofibrillen sowie der Anzahl der Chondrozyten pro Volumeneinheit, ihrer Größe und Orientierung. Möglicherweise gehen in die Ergebnisse histotopochemische Unterschiede der Proteoglykane ein.

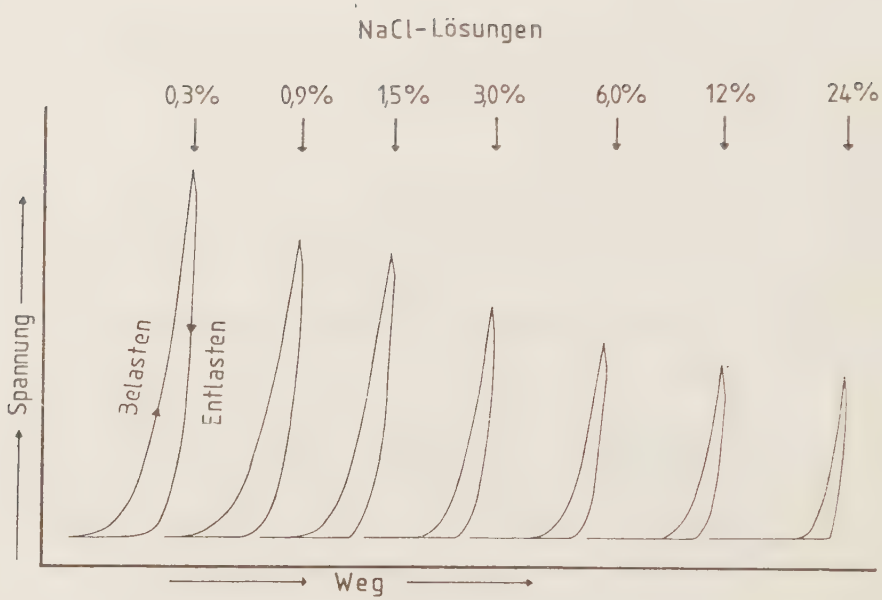

Abb. 4

Be- und Entlastungsdiagramme des o.g. Knorpelzylinders im viscoelastischen Gleichgewichtszustand (steady state) in der jeweiligen Natriumchloridlösung. Die Flächeninhalte der Hystereseschleifen stellen die Verlustarbeit dar. Es handelt sich um wegbegrenzte (deformationsbegrenzte) Hystereseschleifen. Die Zusammendrückung erfolgte um konstante Beträge.

Das mikroskopische Bild des Faserknorpels wird von kollagenen Fasern beherrscht. Diese Knorpelart wird auch als kollagenfasriger Knorpel oder Bindegewebsknorpel bezeichnet. Er enthält gewöhnliche kollagene Fasern, die ohne besondere histologische Färbemethoden und ohne Anwendung von Polarisationsverfahren mikroskopisch zu beobachten sind. Dem elastischen Knorpel verleihen Netze aus Elastin und kollagene Mikrofibrillen elastische Eigenschaften mit entsprechenden Rückstellkräften. Der hyaline Knorpel enthält kein Elastin. Seine kollagenen Mikrofibrillen (Typ II Kollagen) verkörpern zusammen mit einer zähen Matrix aus Proteoglykanen, Elektrolyten und Wasser nicht linear thermo-viscoelastische Eigenschaften. Einen festen Zusammenhalt bewirken die aus Typ I Kollagen bestehenden Fasern des Perichondriums.

Mechanische Belastungsversuche am hyalinen Knorpel von ARNOLD und HARTUNG (1973) zeigten, daß die Be- und Entlastungsdiagramme sich anfangs deutlich unterschieden, bis sich allmählich ein stationärer Zustand oder viscoelastischer Gleichgewichtszustand eingestellt hatte. Man spricht also von Viscoelastizität, wenn sich die Verformung aus einem elastischen Anteil und einem langsamer erfolgenden nicht elastischen Anteil zusammensetzt, wie es der o.g. Versuch deutlich macht. Folgten die Be- und Entlastung des Knorpels dem Hookeschen Gesetz, so ergäbe sich in einem Kraft-Weg Diagramm eine Gerade mit der Funktion $y = ax + b$. Die Kraft-Verformungs- bzw. Druckspannungs-

Stauchungsdiagramme zeigen einen zunächst bogenförmigen Verlauf, der dann kontinuierlich in einen angenähert geraden Kurventeil übergeht. Außerdem sind ausgesprochene Hystereseeigenschaften festzustellen. Die Angaben in der Literatur und eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß im Knorpel im Sinne der physikalischen Rheologie sowohl lineare als auch nichtlineare elastische und viscöse Elemente miteinander verknüpft sind. Wegen des inelastischen Anteils ergibt sich jedoch keine Gerade, sondern eine Hysteresekurve (Abb. 4).

Bei der Hysterese ist der Verformungszustand nicht nur von den augenblicklich herrschenden äußeren Kräften abhängig, sondern auch von dem Weg, der bei der Verformung durchlaufen wird. Bei der Verformung des hyalinen Knorpels wird einerseits ein Teil der zugeführten Energie von der viscösen Komponente gespeichert, andererseits wird Energie in Wärme umgewandelt, so daß er nicht sofort in einem Gleichgewichtszustand steht. Es wird also eine gewisse Zeit zum Energieausgleich benötigt. Dies äußert sich im Kraft-Weg Diagramm (Druckkraft-Verformungs-Diagramm) darin, daß bei der Belastung des Knorpels eine andere Kurve durchlaufen wird als bei der Entlastung (TRAUTWEIN, 1977; POHL, 1962).

Bei der kraftbegrenzten Hysterese sind feste Kraftgrenzen vorgegeben. Die Deformationsbeträge, Hysteresekurven und Flächeninhalte der Hystereseschleifen werden aus dem Diagramm bestimmt. Unter konstant gehaltenen Deformations-

grenzen lassen sich die wegbegrenzten (deformationsbegrenzten) Hystereseschleifen aufzeichnen. Druckkraft, Hysteresekurven und Flächeninhalte der Schleifen werden aus den Diagrammen entnommen.

Die Flächeninhalte der Hystereseschleifen stellen die Verlustarbeit dar. Sie ist zugleich ein Maß für die mechanische Dämpfung. Zur Bestimmung der Flächeninhalte gibt es verschiedene Verfahren:

1. Für die Hystereseschleifen kann eine Approximationsfunktion aufgestellt werden, z.B. $P(t) = at(1-e^{-mt})$. In dieser Bezeichnung ist P die Druckkraft und t die Zeit. Da die vorgegebenen Deformationen $\triangle h$ mit konstanter Deformationsgeschwindigkeit $v_{\triangle h}$ erfolgen, ist $v_{\triangle h} = \triangle h/t$. Mit vereinfachten Symbolen $q = 1/v_{\triangle h}$ sowie $\triangle h = H$ gilt für die Geschwindigkeit $v_{\triangle h}$:

   $$v_{\triangle h} = \frac{\triangle h}{t} = \frac{H}{t}\ ; \quad t = \frac{H}{v_{\triangle h}} = H \cdot q$$

   In die o.g. Gleichung eingesetzt ist

   $$P(H) = aHq(1-\exp(mqH))$$

   oder vereinfacht

   $$P(H) = k_1 H(1-e^{-k_2 H})$$

Wenn die aufsteigende Hysteresekurve mit $P_1(H)$ bezeichnet wird und die absteigende mit $P_2(H)$, so gilt für den Flächeninhalt der Hystereseschleife:

$$W = J_1 - J_2 = \int_{h_1}^{h_2} P_1(H)dH - \int_{h_1}^{h_2} P_2(H)dH$$

W ist die Verlustarbeit, eine skalare Größe mit der physikalischen Dimension dim W = N m = J. Die Verlustarbeit kann auch über ein Linienintegral bestimmt werden.

2. Ohne Kenntnis einer Approximationsfunktion kann die Fläche der Hystereseschleifen graphisch mit Auswertgeräten vorgenommen werden.

Wird die Druckkraft auf den anfänglichen (ursprünglichen) Querschnitt bezogen und die Deformation (Zusammendrückung, axiale Verformung) auf die ursprüngliche Höhe des Knorpelprobezylinders, so ergeben sich folgende Beziehungen:

$$\sigma_d = \frac{P_d}{A_o} \text{ und } \varepsilon_d = \frac{h-h_o}{h_o} = \frac{\triangle h}{h_o}$$

und für die physikalischen Maßeinheiten

$$\dim \sigma_d = \frac{N}{mm^2} ; \quad \dim \varepsilon_d = 0$$

In diesen Formeln bedeuten:

σ_d = Nominaldruckspannung; P_d = Druckkraft; A_o = Ausgangsquerschnittfläche (= ursprüngliche, anfängliche Querschnittsfläche); ε_d = Stauchung (= negative Dehnung); h_o = ursprüngliche (anfängliche) Höhe des Knorpelzylinders; h = variable Höhe des Knorpelzylinders während der biomechanischen Untersuchung.

Mit entsprechenden Umformungen gilt:

$$\sigma_d = u_1 t(1-e^{-u_2 t}) \text{ und}$$

$$W = \int_{\varepsilon_1}^{\varepsilon_2} \sigma_1(\varepsilon)d\varepsilon - \int_{\varepsilon_1}^{\varepsilon_2} \sigma_2(\varepsilon)d\varepsilon$$

Bei der experimentellen Feststellung der Hysteresesschleifen ist der rheologische Zustand der Gewebsprobe zu beachten. Es ist zu unterscheiden zwischen transienten Vorgängen, die von der mechanischen Vorgeschichte abhängig sind und dem stationären Zustand (viscoelastischer Gleichgewichtszustand, "steady state", "Gleichmaßverhalten").

Gewebsarten mit reichlich viscöser Grundsubstanz wie der hyaline Knorpel, der nucleus pulposus und die Nabelschnur haben im Vergleich zu dehnungsbeanspruchten Sehnen und Bändern einen relativ niedrigen Elastizitäts-

modul, jedoch eine ausgeprägte Hysterese, d.h. nach Entlastung gewinnen sie ihre ursprüngliche Form nur langsam zurück (GROSS et al., 1976; SIEGENTHALER et al., 1976

Durch die verschieden hohen Elektrolytkonzentrationen kommt es einmal aufgrund der Osmolaritätsänderung zur Wasserverschiebung, zum anderen bewirken die zugeführten Kationen eine Herabsetzung der Ladung an den Sulfat- und Carboxylgruppen der Mucopolysaccharide wodurch der Zusammenhang der kolloidalen Aggregate reduziert wird (HASCALL und SAJDERA, 1969). Kochsalzlösungen steigender Konzentrationen führen also zur Viscositätsabnahme der Knorpelgrundsubstanz wohingegen die elastische Komponente des Knorpels in den Vordergrund rückt, da sie durch die Elektrolyteinwirkungen nicht oder nur sehr wenig beeinflußt wird.

Wie man nun an den Hystereseschleifen mit den kleinen Flächeninhalten erkennen kann, hat das Knorpelprobestück, welches der Lösung hoher Konzentrationen ausgesetzt war, eine große Elastizität jedoch fast keine viscöse Komponente mehr. Die gesättigte NaCl-Lösung bewirkte innerhalb kürzester Zeit durch massive Störung des elektrostatischen Gleichgewichts eine Verklumpung des extrazellulären Makroaggregats, was zu einer irreversiblen Denaturierung des Knorpels führte.

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 1	0,9	0,41	100	1860
	0,3	0,50	+ 22,0	1980
	1,5	0,40	- 2,4	1420
	3,0	0,32	- 22,0	880
	6,0	0,27	- 34,1	600
	12	0,23	- 43,9	550
	24	0,22	- 46,3	512
KNORPEL NR 3	0,9	0,24	100	1217
	0,3	0,27	+ 12,5	1360
	1,5	0,19	- 20,8	829
	3,0	0,12	- 50,0	553
	6,0	0,11	- 54,2	450
	12	0,10	- 58,3	375
	24	0,11	- 54,2	320

Tab. 1

Das Verhalten der Knorpelzylinder 01 und 03, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hysteresesschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 2	0,9	0,30	100	1320
	0,3	0,36	+ 20,0	1560
	1,5	0,32	+ 6,7	1230
	3,0	0,28	- 6,7	970
	6,0	0,27	- 10,0	893
	12	0,26	- 13,3	865
	24	0,23	- 23,3	495
KNORPEL NR 4	0,9	0,29	100	1625
	0,3	0,30	+ 3,4	1745
	1,5	0,21	- 22,6	1168
	3,0	0,19	- 34,5	896
	6,0	0,15	- 48,3	865
	12	0,13	- 55,2	493
	24	0,11	- 62,1	283

Tab. 2

Das Verhalten der Knorpelzylinder 02 und 04, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 5	0,9	0,28	100	1335
	0,3	0,38	+ 35,7	1800
	1,5	0,28	± 0,0	1195
	3,0	0,22	- 21,4	o855
	6,0	0,16	- 42,9	550
	12	0,14	- 50,0	455
	24	0,12	- 57,1	277
KNORPEL NR 6	0,9	0,19	100	1047
	0,3	0,25	+ 31,6	1462
	1,5	0,18	- 5,3	932
	3,0	0,14	- 26,3	640
	6,0	0,09	- 52,6	392
	12	0,07	- 63,2	256
	24	0,03	- 84,2	125

Tab. 3

Das Verhalten der Knorpelzylinder 05 und 06, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 7	0,9	0,43	100	2150
	0,3	0,47	+ 9,3	2360
	1,5	0,30	-30,2	1422
	3,0	0,24	-44,2	975
	6,0	0,21	-51,2	692
	12	0,17	-60,2	532
	24	0,15	-65,1	360
KNORPEL NR 8	0,9	0,42	100	2586
	0,3	0,64	+ 52,4	3510
	1,5	0,45	+ 7,1	2011
	3,0	0,30	- 28,6	1195
	6,0	0,25	- 40,5	687
	12	0,21	- 50,0	620
	24	0,19	- 54,8	398

Tab. 4

Das Verhalten der Knorpelzylinder 07 und 08, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleif

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 9	0,9	0,38	100	1453
	0,3	0,44	+ 15,8	1753
	1,5	0,37	- 2,6	1326
	3,0	0,32	- 15,8	1060
	6,0	0,25	- 34,2	736
	12	0,21	- 44,7	550
	24	0,16	- 57,9	336
KNORPEL NR 10	0,9	0,37	100	1702
	0,3	0,43	+ 16,2	1990
	1,5	0,35	- 5,4	1586
	3,0	0,28	- 24,3	1046
	6,0	0,24	- 35,1	804
	12	0,20	- 45,9	580
	24	0,17	- 54,1	425

Tab. 5

Das Verhalten der Knorpelzylinder 09 und 10, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 11	0,9	0,45	100	2180
	0,3	0,46	+ 2,2	2260
	1,5	0,39	-13,3	1782
	3,0	0,37	-17,8	1490
	6,0	0,34	-24,4	1290
	12	0,30	-33,3	1000
	24	0,27	-40,0	680
KNORPEL NR 12	0,9	0,38	100	1663
	0,3	0,47	+ 23,7	2481
	1,5	0,34	- 10,5	1393
	3,0	0,27	- 28,9	955
	6,0	0,23	- 39,5	748
	12	0,19	- 50,8	582
	24	0,14	- 63,2	321

Tab. 6

Das Verhalten der Knorpelzylinder 11 und 12, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 13	0,9	0,34	100	1378
	0,3	0,37	+ 8,8	1471
	1,5	0,30	-11,8	1030
	3,0	0,25	-26,5	793
	6,0	0,21	-38,2	575
	12	0,16	-52,9	418
	24	0,11	-67,6	218
KNORPEL NR 14	0,9	0,45	100	2008
	0,3	0,52	+15,6	2590
	1,5	0,46	+ 2,2	1860
	3,0	0,35	-22,2	1416
	6,0	0,29	-35,6	995
	12	0,24	-46,7	783
	24	0,21	-53,3	481

Tab. 7

Das Verhalten der Knorpelzylinder 13 und 14, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 15	0,9	0,18	100	889
	0,3	0,23	+ 27,8	1168
	1,5	0,20	+ 11,1	907
	3,0	0,14	- 22,2	560
	6,0	0,12	- 33,3	420
	12	0,09	- 50,0	300
	24	0,08	- 44,4	208
KNORPEL NR 16	0,9	0,30	100	1600
	0,3	0,33	+ 10,0	1900
	1,5	0,30	± 0,0	1487
	3,0	0,26	- 13,3	1121
	6,0	0,22	- 26,7	832
	12	0,20	- 33,3	648
	24	0,16	- 46,7	404

Tab. 8

Das Verhalten der Knorpelzylinder 15 und 16, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 17	0,9	0,19	100	1230
	0,3	0,21	+ 10,5	1339
	1,5	0,16	- 15,8	955
	3,0	0,12	- 36,8	643
	6,0	0,10	- 47,4	489
	12	0,09	- 52,6	385
	24	0,07	- 63,2	208
KNORPEL NR 18	0,9	0,30	100	1460
	0,3	0,34	+ 13,3	1692
	1,5	0,28	- 6,7	1289
	3,0	0,19	- 36,7	760
	6,0	0,16	- 46,7	612
	12	0,14	- 53,3	466
	24	0,10	- 66,7	258

Tab. 9

Das Verhalten der Knorpelzylinder 17 und 18, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösung; A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleife;

	NaCl-Lösung [%]	P_{sp} [N/mm²]	P_{sp} [%]	A [mm²]
KNORPEL NR 19	0,9	0,29	100	1397
	0,3	0,33	+13,8	1580
	1,5	0,25	-13,8	1242
	3,0	0,19	-34,5	898
	6,0	0,16	-44,8	620
	12	0,14	-51,7	498
	24	0,10	-65,5	357
KNORPEL NR 20	0,9	0,25	100	1400
	0,3	0,30	+20,0	1670
	1,5	0,24	- 4,0	1227
	3,0	0,19	-24,0	932
	6,0	0,15	-40,0	660
	12	0,12	-52,0	431
	24	0,09	-64,0	219

Tab. 10

Das Verhalten der Knorpelzylinder 19 und 20, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden; dabei bedeuten: P_{sp} (N/mm^2 = Druckspannung der Probestücke unter Belastung in der jeweiligen Elektrolytkonzentration; P_{sp} (%) = prozentuale Abweichung der Druckspannung von der in 0,9%iger NaCl-Lösun
A (mm^2) = Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschlei

NaCl-Lösung	$s^2=\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2$		$s=\sqrt{s^2}$ [%]	
[%]	mit Ausreißer	ohne Ausreißer	mit Ausreißer	ohne Ausreißer
0.3	133.00	74.18	11.53	8.61
1.5	122.87	88.00	11.08	9.38
3.0	103.12	78.82	10.15	8.88
6.0	107.44	66.57	10.37	8.16
12.0	116.71	56.00	10.80	7.48
24.0	153.68	100.00	12.30	10.00

Tab. 11

Aufstellung über die empirische Varianz s^2 und die Streuung s der zwanzig Knorpelprobezylinder, die um einen vorgegebenen Betrag in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen komprimiert wurden.

NaCl-Lösung [%]	$\bar{X}_a$ [%]	$\bar{X}_b$ [%]
0.3	+ 17.7	+ 15.9
1.5	- 6.7	- 5.2
3.0	- 26.8	- 25.6
6.0	- 38.6	- 40.1
12.0	- 48.0	- 49.8
24.0	- 56.7	- 58.5

Tab. 12

Mittlerer prozentualer Spannungsabfall bzw. -anstieg $\bar{X}$ bezogen auf die Spannung des Knorpels unter Belastung in einer 0,9%igen NaCl-Lösung; dabei ist:

a) $\bar{X}_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$ mit Ausreißer

b) $\bar{X}_b = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} x_i$ ohne Ausreißer

3. Die Wirkung von Calcium auf das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels

3.1 Calcium

Der größte Teil des Körpercalciums ist als Carbonat- und Hydroxylapatit im Skelettsystem gespeichert. Der tägliche Bedarf wird durch eine gemischte Nahrung reichlich gedeckt. Für eine schnelle Resorption sorgen in der Intestinalflüssigkeit vorhandenes Vitamin D und Citrat. Die Calciumkonzentration im Blutplasma beträgt 9 - 11 mg/100 ml, davon liegen ca. 4 mg/100 ml in Ionenform vor. Die Ausscheidung des zweiwertigen Minerals erfolgt zu 15 % in den Nieren, der Rest durch den Dickdarm (BUDDECKE, 1977). Für einen ungestörten Stoffwechselablauf im menschlichen Organismus spielt das Calcium eine erhebliche Rolle. Einerseits dient es als Mittlersubstanz zwischen den bioelektrischen Phänomenen an der Nerven- bzw. Muskelfaseroberfläche und den kontraktilen Reaktionen im Faserinneren; andererseits hat es eine fördernde Wirkung auf die a-Lipase des Pankreas, deren Bedeutung in der Abspaltung der Fettsäuren von den Triglyceriden besteht. Auf dem Gebiet der Hämostase wirkt Calcium in Verbindung mit einem Phospholipid als Aktivator des Gerinnungsfaktors X (Stuart Prower-Faktor) (KEIDEL, 1979).

Wie oben schon erwähnt, haben die anionischen Ladungen der Mucopolysaccharidproteine die Fähigkeit besonders viel Calcium zu binden. Die folgenden Versuche sollen Aufschluß darüber geben, ob und wie sich die mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels in Anwesenheit von Calcium ändern.

3.2 Problemstellung der ersten Versuchsreihe

Änderung der uniaxialen Deformation unter konstanter Belastung des hyalinen Knorpels nach zwischenzeitlicher Gabe einer 10%igen Calciumgluconat-Lösung

3.2.1 Präparation der Knorpelprobestücke siehe 2.1

3.2.2 Versuchsaufbau siehe 2.2

3.2.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf

Zuerst wurde das Untersuchungsgut mehrfach mit einer Frequenz von 0,11 Hz bei einem Papiervorschub von 250 mm/h, einer Kompressionsgeschwindigkeit von 1,5 mm/min anfangs um 0,27 mm und nach Nullpunktverschiebung um 0,15 mm so lange rhythmisch komprimiert, bis sich ein viscoelastisches Gleichgewicht eingestellt hatte. Nach einer vierminütigen Erholungsphase wirkte eine Dauerkraft von 10 N über einen Zeitraum von 45 min auf den Knorpel ein (Abb. 5).

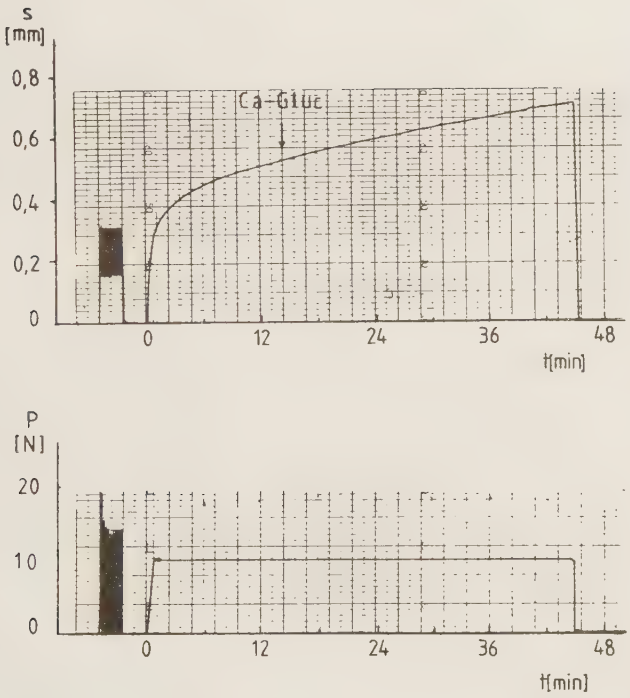

Abb. 5

Nach Vorbelastung des präformierten Knorpelzylinders mit einer Frequenz von 0,11 Hz wirkte eine Dauerkraft von 10 N auf ihn ein (Kraft-Zeit Diagramm). Die Abbildung zeigt einen Kurvenanstieg während der Dauerbelastung im gleichzeitig aufgezeichneten Weg-Zeit Diagramm. Eine zwischenzeitliche Gabe von Calciumgluconat vermochte den gleichmäßigen Kurvenverlauf nicht zu ändern.

3.2.4 Ergebnisse

Die Abb. 5 zeigt nach vorausgegangenen zyklischen Beanspruchungen unten eine definierte Druckkraft-Zeit Eingangsfunktion. Im geschlossenen Regelkreissystem kann die Untersuchungsanlage so eingestellt werden, daß die Kraft zeitproportional in Form einer geraden Strecke ansteigt. An sie schließt sich eine vorgewählte vom Regelkreissystem konstante Druckkraft von 10 N an. Die zeitproportionale Druckkraftvergrößerungsphase dauert 30 Sekunden. Als Folge der ursächlichen Druckkraft-Zeit Eingangsfunktion ist eine Zusammendrückungs-Zeit Ausgangsfunktion (Deformations-Zeit Ausgangsfunktion) zu beobachten. Sie ist auf Abb. 5 oben synchron zur Druckkraft-Zeit Eingangsfunktion (input funct dargestellt.

Im Anschluß an den anfangs steilen Verlauf der Wegdarstellung in den ersten 30 Sekunden bis zur Knorpeldauerbelast mit 10 N nähert sich die Kurve allmählich der x-Achsenparallen zu, ohne in eine solche nach 45 minütiger Belastung übergegangen zu sein. Die nach 13 Minuten anstelle der Ringerlösung hinzugefügte Calciumlösung vermochte den gleichmäßigen Kurvenverlauf nicht oder bei einzelnen Versuchen in graphisch nur unscheinbarer Weise zu beeinfluss Besonders eindrucksvoll ist jedoch der Kompressionsbetrag nach einer Belastung von 45 min. Zu diesem Zeitpunkt ist Eindrucktiefe des Knorpels gegenüber der nach zwei Minute

Belastung um fast das Doppelte angestiegen. Eine einstündige Entlastung nach Versuchsablauf zeigte, daß der Untersuchungszylinder trotz längerer Dauerbelastung seine ursprüngliche Dicke von 3,8 mm vollständig zurückgewonnen hatte (s. Tab. 13).

Zeit t [min]	Weg s [mm]
2	0.37
4	0.42
6	0.45
12	0.51
18	0.56
24	0.60
30	0.64
36	0.67
42	0.70
45	0.72

Tab.13

Änderung des Weges (Zusammendrückungsbetrag) in zeitlicher Abhängigkeit unter konstanter Knorpelbelastung in Ringer- bzw. Calciumgluconat-Lösung

3.3 Problemstellung der zweiten Versuchsreihe

Änderung der uniaxialen Deformation unter konstanter Belastung des hyalinen Knorpels nach zwischenzeitlicher Gabe einer 0,9%igen Calciumchloridlösung

3.3.1 Präparation des Knorpels siehe 2.1

3.3.2 Versuchsaufbau siehe 2.2

3.3.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchablauf

Datenangaben:

einmalige Kompressionstiefe	0,37 mm
- nach Nullpunktverschiebung	0,24 mm
Kompressionsfrequenz	0,11 Hz
Kompressionsgeschwindigkeit	2,5 mm/min
Kraftlimit	20,0 N
Registrierpapier-vorschubgeschwindigkeit	250 bzw. 125 mm/h
Dauerbelastung	10 N

Nach Begrenzung des Kompressionswegs wurden die Probestückchen wiederum so lange belastet, bis sich ein viskoelastisches Gleichgewicht eingestellt hatte. Danach wurde die Papiervorschubgeschwindigkeit von 250 mm/h um die Hälfte gesenkt. Einer fünfminütigen Erholungsphase schloß sich eine Dauerbelastung von 10 N über einen Zeitraum von etwa einer Stunde an (Abb. 6).

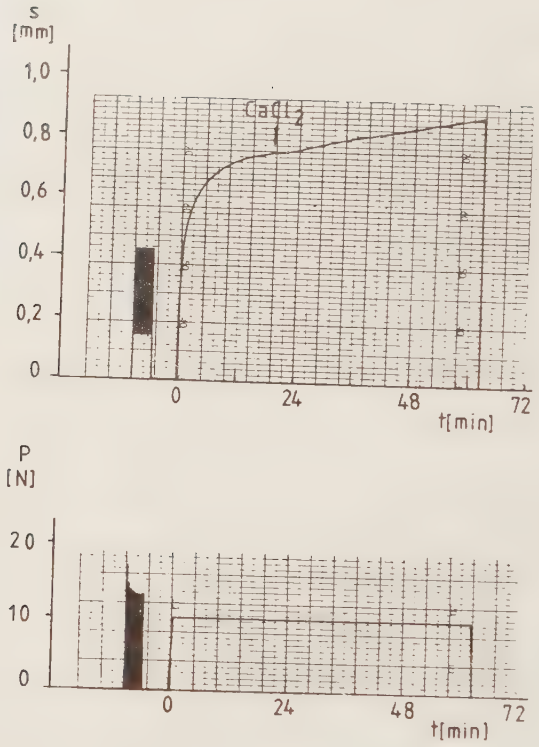

Abb. 6

Nach Vorbelastung des präformierten Knorpelzylinders mit einer Frequenz von wiederum 0,11 Hz wirkte die gleiche Dauerkraft auf das Probestück ein wie im vorherigen Versuch. Aus dem anfänglich hyperbelartigen Kurvenverlauf ergibt sich nach zwischenzeitlicher Zufuhr einer 0,9%igen Calciumchloridlösung eine Gerade mit sprunghaft einsetzendem Steigungsanstieg.

.3.4 Ergebnisse

Wie im o.a. Versuch, so ist auch hier die Kurve anfangs bestrebt nach initial steilem Verlauf in eine x-Achsen-parallele überzugehen. Unter Einwirkung der nach 17 min an Stelle der Ringerlösung dem Knorpel verabreichten 0,9%igen Calciumchloridlösung geht die Hyperbel annähernd in eine Gerade mit der Steigung a über; d.h.: Nach Milieu-änderung muß der Kompressionsweg linear ansteigen, damit der Knorpel eine Dauerspannung von 10 N über einen bestimmten Zeitraum aufrechterhalten kann. Auch nach diesem Versuch gewann der Knorpel nach ausreichendem Entlastungszeitraum seine ursprüngliche Dicke zurück (Tab. 14).

Zeit t [min]	Weg s [mm]
2	0,56
4	0,62
6	0,67
8	0,70
10	0,71
12	0,72
18	0,74
24	0,76
30	0,79
36	0,80
42	0,82
48	0,83
54	0,85
60	0,86

Tab. 14

Änderung des Weges (Zusammendrückungsbetrag) in zeitlicher Abhängigkeit unter konstanter Knorpelbelastung in Ringer- bzw. Calciumchloridlösung

3.4 Problemstellung der dritten Versuchsreihe

Wie ändert sich die Spannung des hyalinen Knorpels unter konstanter Kompression nach zwischenzeitlicher Gabe einer 0,9%igen bzw. 9 % Calciumchloridlösung?

3.4.1 Präparation des Knorpels siehe 2.1

3.4.2 Versuchsaufbau siehe 2.2

3.4.3 Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf

Datenangaben

Kompressionsbegrenzung	0,15 mm
Kompressionsgeschwindigkeit	1,5 mm/min
Kompressionsfrequenz	0,066 Hz
Registrierpapier-vorschubgeschwindigkeit	4,16 mm/min
obere Kraftgrenze	20 N

Um das vom Brustbein eines 2 Monate alten Kalbes frisch entnommene Untersuchungsgut ausreichend an das ihn umgebende Milieu (Ringerlösung, 37°C) zu adaptieren, war es notwendig, den Knorpel über einen Zeitraum von 2 Stunden vorzubelasten. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde ihm die Ringerlösung entzogen und eine 0,9%ige bzw. 9%ige Calciumchloridlösung zugeführt (Abb. 7).

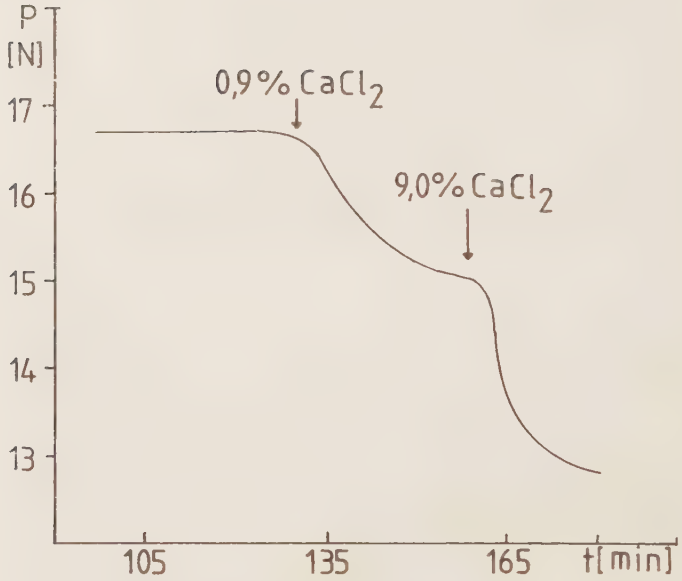

Abb. 7

Spannungsverlust des normierten Knorpelzylinders nach Zufuhr 0,9%iger und anschließender 9,0%iger Calciumchloridlösung. Zuvor war das Probestück über einen Zeitraum von zwei Stunden einer rhythmischen Kompression mit einer Frequenz von 0,066 Hz ausgesetzt. Die obere Kraftgrenze war auf 20 N limitiert.

Zeit [min]	P [N]
105	16,7
120	16,7
126	16,7
135	16,3
150	15,2
160	15,0
165	13,7
180	12,8

Tab. 15

Zeitabhängiger Kraftrückgang unter Einwirkung einer 0,9%igen $CaCl_2$-Lösung

3.4.4 Ergebnisse

Nach Verabreichung der 0,9%igen Calciumchloridlösung erfolgt innerhalb von 35 min ein abrupter Spannungsrückgang um ca. 1,5 N. Auf die anschließende zehnfache Konzentrationserhöhung reagiert der Knorpel in nur 20 min mit einer Kraftverminderung von 15,0 N auf 12,8 N (Tab. 15).

3.5 Problemstellung der vierten Versuchsreihe

Wie verhält sich unter isometrischen Bedingungen die Knorpelspannung nach zwischenzeitlichen Milieuänderungen?

3.5.1 Präparation des Knorpels siehe 2.1

3.5.2 Versuchsaufbau siehe 2.2

3.5.3 Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf

Datenangaben

Kompressionsgeschwindigkeit	1,5 mm/min
Kompressionsweg	1 mm
Kraftbegrenzung	8 N
Relaxionsdauer	42 sec
Kraftrückgewinndauer	42 sec

Vor jeder Milieuänderung wurde der Knorpel solange belastet, bis er sich weitgehend im viscoelastischen Gleichgewichtszustand befand.

Abb. 8

Abhängigkeit der Relaxations- und Kraftrückgewinnendpunkte R1 - R5 und P1 - P5 unter Einwirkung unterschiedlicher Elektrolytlösungen und Elektrolytkonzentrationen im Kraft-Zeit Diagramm. Es bedeuten:

1 Belastung des Probestückes in Ringerlösung
2 Belastung des Probestückes in 0,9%iger $CaCl_2$-Lösung
3 Belastung des Probestückes in 9,0%iger $CaCl_2$-Lösung
4 Belastung des Probestückes in 10,0%iger Ca-Gluconat-Lö
5 Belastung des Probestückes in Ringerlösung

Auf der Abszisse steht jeweils die Zeit t in Sekunden, auf der Ordinate die Druckkraft P in Newton.

3.5.4 Ergebnisse

Die Zusammendrückung eines Knorpelzylinders in Richtung seiner Zylinderachse bezüglich seiner Höhe h um den Teilbetrag $h = h_0 - h$ wird auch als uniachsiale Kompression bezeichnet. Dabei ist $\triangle h$ der Zusammendrückungs- oder Kompressionsbetrag. Die anfängliche Höhe ist h_0 und h die Höhe, die sich aufgrund des Zusammendrückungsvorganges ergibt. Wird ein Probezylinder um einen Teilbetrag innerhalb des schädigungsfreien Bereiches zusammengedrückt, und dieser Zustand unmittelbar an den Kompressionsvorgang konstant gehalten, so erfolgt die Einhaltung einer bestimmten Höhe h. Diese ist kleiner als die Höhe vor dem Beginn des Zusammendrückungsvorganges. Die nach einem unmittelbar vorangegangenen Zusammendrückungsvorgang konstant gehaltene Höhe stellt isometrische Bedingungen dar. Als Folge einer Teilkompression mit anschließend eingehaltener isometrischer Bedingung ist eine Druckkraft-Zeit Kurve zu beobachten. Sie setzt sich aus den aufeinander folgenden Teilbereichen Druckkraftvergrößerung und Relaxation zusammen. Die Verringerung des Ausmaßes der Zusammendrückung mit einer bestimmten Geschwindigkeit ist auch als Teildekompression zu bezeichnen. Wird die Zusammendrückung vollständig rückgängig gemacht, so ist dieser Vorgang als vollständige Dekompression zu benennen.

Eine Teilkompression eines Knorpelstückes mit unmittelbar anschließend konstant gehaltenem Dekompressionsbetrag stellt einen isometrischen Zustand mit bestimmter Vorgeschichte in Form vorausgehender mechanischer Ereignisse dar. Als Folge eines partiellen Dekompressionsvorganges mit anschließend konstant gehaltenem Zusammendrückungsbetrag ist bezüglich der Druckkraft-Zeit Kurve oder auf den initialen Querschnitt bezogen der Nominaldruckkraft-Zeit Kurve ein Kraft- bzw. Spannungsabfall zu beobachten, an den sich dann unter den isometrischen Eingangsbedingungen eine zeitabhängige, protrahierte Kraft- bzw. Spannungszunahme anschließt, die sich einem festen Grenzwert nähert oder erneut in Form einer Sekundärrelaxation abfällt. Die protrahierte Kraft- bzw. Spannungszunahme unter den genannten Voraussetzungen wird Kraftrückgewinnerscheinung (Spannungsrückgewinnerscheinung) oder mechanische Erholung genannt. Sie kann im Sinne der Theorie viscoelastischer Körper als inverse Erscheinung der Relaxation aufgefaßt werden. Der Kraftrückgewinnerscheinung im isometrischen Versuch entspricht die viscoelastische Nachwirkung im isotonischen Versuch. All diese Erscheinungen gehen an den Bandscheiben, Gelenk- und Rippenknorpeln in vivo ineinander über. Sie sind für die Erholungsvorgänge am Knorpel in Ruhe von fundamentaler Bedeutung. Ihre Störung ist als ein ungünstiges histomechanisches Ereignis zu werten, das zu Knorpelschäden führen kann. Wegen der ausgesprochenen Empfindlichkeit mechanisch-rheologischer Erscheinungen,

zu denen die genannten Phänomene zu rechnen sind, eignen sie sich als Indikator mechanischer Vorgänge.

Unsere Aufmerksamkeit gilt den Endpunkten der Kraftrückgewinn- (P_1 bis P_5) und Relaxationskurven (R_1 bis R_5) in Abbildung 8. Nach Zufuhr 0,9%iger Calciumchloridlösung ist der Relaxationsendpunkt R_2 auf einem niedrigeren Niveau als R_1, während der Endpunkt der Kraftrückgewinnkurve P_2 im Vergleich zu P_1 gestiegen ist. Eine zehnfache Konzentrationserhöhung läßt sowohl R_3 als auch P_3 rapide abfallen. Die Wirkung einer 10%igen Lösung aus Calciumgluconat und Calciumsaccharat ist genau umgekehrt wie die der 0,9%igen Calciumchloridlösung. Während P_4 weiter gesunken ist, haben wir bei R_4 wieder einen Anstieg zu verzeichnen. Erst unter anschließendem Einfluß einer Ringerlösung erreichen R_5 und P_5 jeweils wieder ihr Ausgangsniveau.

3.5.5 Interpretation

Alle vier Versuche verdeutlichen, daß unter der Wirkung von Calciumionen der unter Belastung stehende Knorpel mit einem teilweisen massiven Spannungsrückgang reagiert. Aus den ersten beiden Versuchen wird ersichtlich, daß lediglich Calciumchlorid, welches in Aqua dest. sofort in Ca^+ und Cl^- dissoziiert, das mechanische Verhalten des Knorpels negativ beeinträchtigt. Die gebundene Form des Calciums vermochte in der Versuchsreihe keine auffälligen Befunde hervorzurufen. Während jedoch im vierten Versuch die chlorierte Form ebenfalls einen Spannungsverlust provozierte, bewirkte die an Gluconat gebundene einen Kraftanstieg (R_4). Besonders auffällig in diesem Versuch war ferner das bezüglich der Relaxationskurven umgekehrte Verhalten der Kraftrückgewinnungskurven nach Zufuhr 0,9%iger Calciumchlorid- bzw. 10%iger Calciumgluconat-d-saccharatlösung.

Wird der Knorpel rhythmisch belastet, wie im Versuch drei, so vermag schon eine geringe Konzentration Calciumchlorid gelöst in Aqua dest. die Spannung soweit zu reduzieren, daß selbst die folgende zehnfache Konzentrationserhöhung nicht viel wirkungsvoller ist.

Legt man zugrunde, daß gerade der hyaline Knorpel reich an Chondroitinsulfat ist, welches eine besondere hohe Affinität zu den Calciumionen hat, daß sich ferner durch den erfolgte

Ladungsverlust die kolloidalen, interzellulären Aggregate nicht mehr abstoßen, sondern "verklumpen", woraus eine Viscositätsabnahme resultiert, so kann der Betrachter leicht abschätzen, warum eine nur geringe Ionenkonzentration einen solch enormen Spannungsverlust am hyalinen Knorpel herbeiführen kann. Steigert man jedoch die Konzentration der Calciumchloridlösung um ein vielfaches mehr im Vergleich zu den vorgelegten Untersuchungen, so erfolgt eine Extraktion der Proteoglycane aus der Knorpelgrundsubstanz. Der Knorpel verliert seine viscöse Komponente vollkommen und reagiert auf Belastung ähnlich wie unter unten beschriebenem Enzymeinfluß (MAROUDAS et al., 1969; MAROUDAS, 1970; CAEL, 1978).

4. Die Wirkung von Elastase auf den hyalinen Knorpel

4.1 Elastase

Wie alle bisher erforschten Enzyme ist auch die Elastase ein Proteoenzym, welches von den exokrinen Acinuszellen des Pankreas als Proelastase gebildet und durch eine spezifische Kinase in Gegenwart von Calcium in das aktive Ferment Elastase überführt wird. Da es mit seinem aktiven Zentrum Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptidkette spaltet zählt man es zu der Gruppe der Endopeptidasen. Der Angriffspunkt liegt vornehmlich zwischen einer neutralen Aminosäure und einem beliebigen Aminosäurerest.

- R - neutr. As ↓ R -

(BUDDECKE, 1977)

4.2 Präparation der Enzymlösung

Das pH Optimum der Elastase liegt zwischen pH 7,5 und pH 8,5. Als Puffer diente hochmolekulares Rinderserumalbumin gelöst in Dinatriumhydrogenphosphat bzw. Natriumdihydrogenphosphat. Um das Temperaturoptimum, unter dem das Enzym seine größte Aktivität entwickelt zu erreichen, war es notwendig, die Konservierungstemperatur von 4°C auf 37°C nach o.g. Verfahren zu erhöhen und konstant zu halten (s. 2.2).

4.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels

Versuchsobjekte waren, wie oben schon beschrieben, präformierte Knorpelzylinder mit einem Durchmesser von 6,4 mm und einer Höhe von 3,8 mm vom Brustbein eines ca. drei bis vier Monate alten Kalbes (s. 2.1). Bei unverändertem Versuchsaufbau (s. 2.2) und unter konstanten Bedingungen wurden nach Einstellung des Kraft-Meßbereichs auf maximal 20 N sechs Knorpelstückchen in Ringerlösung vor dem Hauptversuch jeweils zehnmal mit einer Kompressionsfrequenz von 0,13 Hz und einer Kompressionsgeschwindigkeit von 2,5 mm/min um konstant 0,1 % ihrer Höhe bei einem Papiervorschub von 12,5 mm/min vorbelastet. Auf die Vorbelastung kann insofern nicht verzichtet werden, als daß sich der Knorpel einerseits an das ihn umgebende Milieu per Diffusionem adaptieren muß, andererseits kann sich der Untersucher davon überzeugen, ob der Knorpel festen Kontakt mit dem Druckstempel und dem Becherboden hat. Eine Verschiebung und Lockerung würde durch abnorme und unregelmäßige Zackenbildungen in der graphischen Darstellung mit dem Registriergerät auffallen.

Versuchsablauf

Nach einer Erholungsphase von fünf Minuten wurden die Zylinder Nr. 1 - 6 einer zwanzigminütigen Kompressionsbelastung ausgesetzt. Anschließend wurden die Knorpel Nr. 1 - 3 zwanzig Stunden in Ringerlösung, Knorpel Nr. 4 - 6 ebensolange

in gepufferter Elastaselösung inkubiert, um dann wiederum zwanzig Minuten lang konstant um 0,3 mm komprimiert zu werden. Einer nochmaligen Inkubation von zwanzig Stunden schloß sich eine letzte rhythmische Belastung unter gleichen Bedingungen an (s. Abb. 9).

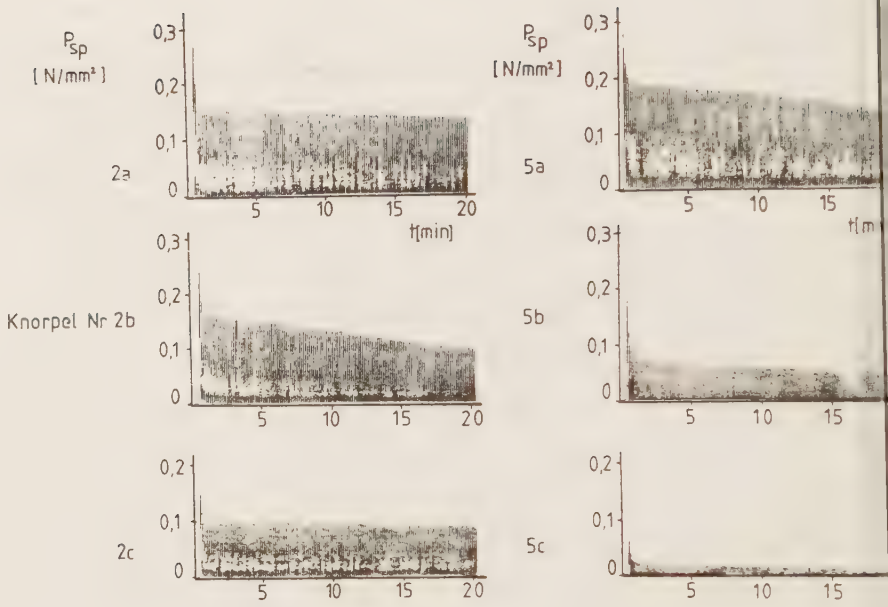

Abb. 9

Kompressionsdiagramme der präformierten Knorpelzylinder Nr. 2 und 5:

2a: Belastung des Knorpel Nr. 2 in Ringerlösung 20 min lang.

2b: Belastung des Knorpel Nr. 2 nach 20 Std. Inkubation in Ringerlösung 20 min lang.

2c: Belastung des Knorpel Nr. 2 nach 40 Std. Inkubation in Ringerlösung 20 min lang.

5a: Belastung des Knorpel Nr. 5 in Ringerlösung 20 min lang.

5b: Belastung des Knorpel Nr. 5 nach 20 Std. Inkubation in Elastaselösung 20 min lang.

5c: Belastung des Knorpel Nr. 5 nach 40 Std. Inkubation in Elastaselösung 20 min lang.

Knorpel Nr. 1

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 40 Std. in Ringerlösung (%)
0,125	0,31	32,2	40,7
0,250	0,24	36,0	47,1
0,375	0,22	38,0	50,0
0,500	0,20	35,6	50,8
0,750	0,19	36,3	52,1
1,000	0,19	38,2	53,1
2,000	0,17	35,3	51,1
4,000	0,16	32,6	48,0
8,000	0,15	28,2	44,5
12,000	0,16	43,1	48,0
16,000	0,15	44,5	44,5
20,000	0,14	45,9	40,6
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 37,2 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 47,5 %

Tab. 16

Belastung des Knorpels Nr. 1 in Ringerlösung; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 2

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 40 Std. in Ringerlösung (%)
0,125	0,29	19,0	46,5
0,250	0,21	0,0	42,3
0,375	0,19	6,3	43,1
0,500	0,17	0,0	39,7
0,750	0,16	0,0	38,5
1,000	0,16	0,0	39,6
2,000	0,15	0,0	35,6
4,000	0,15	2,7	34,4
8,000	0,15	9,1	34,4
12,000	0,14	16,1	33,6
16,000	0,14	22,8	35,7
20,000	0,13	27,1	30,7
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 8,6 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 37,8 %

Tab. 17

Belastung des Knorpels Nr. 2 in Ringerlösung; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) =mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 3

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 40 Std. in Ringerlösung (%)
0,125	0,31	9,5	4,0
0,250	0,23	19,2	19,3
0,375	0,21	22,4	26,0
0,500	0,19	19,3	25,3
0,750	0,17	16,3	25,5
1,000	0,16	13,6	25,5
2,000	0,14	9,5	23,0
4,000	0,13	8,3	21,4
8,000	0,10	11,8	1,6
12,000	0,09	18,0	5,2
16,000	0,08	20,7	16,1
20,000	0,08	11,4	13,7
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 15,0 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 15,1 %

Tab. 18

Belastung des Knorpels Nr. 3 in Ringerlösung; dabei bedeuten: t (min = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 4

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	- P_{sp} nach 20 Std. in Elastase (%)	- P_{sp} nach 40 Std. in Elastase (%)
0,125	0,40	37,0	39,8
0,250	0,31	46,8	59,1
0,375	0,28	50,0	63,5
0,500	0,27	53,1	67,0
0,750	0,26	55,6	69,4
1,000	0,25	55,3	69,7
2,000	0,23	58,0	71,1
4,000	0,21	59,3	70,3
8,000	0,17	60,0	66,6
12,000	0,13	52,0	59,5
16,000	0,10	45,0	48,8
20,000	0,07	24,6	32,1
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 50,0 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 59,3 %

Tab. 19

Belastung des Knorpels Nr. 4 in Elastase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 5

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Elastase (%)	$-P_{sp}$ nach 40 Std. in Elastase (%)
0,125	0,27	33,4	76,9
0,250	0,22	45,8	82,8
0,375	0,20	48,9	83,9
0,500	0,19	52,1	85,1
0,750	0,19	56,2	87,1
1,000	0,18	54,8	86,7
2,000	0,18	58,9	88,4
4,000	0,18	63,0	89,5
8,000	0,17	64,4	90,0
12,000	0,16	64,5	90,7
16,000	0,14	60,7	90,5
20,000	0,12	57,6	90,4
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 55,0 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 86,8 %

Tab. 20

Belastung des Knorpels Nr. 5 in Elastase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 6

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Elastase (%)	$-P_{sp}$ nach 40 Std. in Elastase (%)
0,125	0,40	29,9	63,0
0,250	0,31	49,9	73,8
0,375	0,30	57,8	77,8
0,500	0,30	61,5	79,8
0,750	0,29	64,8	81,7
1,000	0,29	66,1	82,3
2,000	0,28	69,5	84,5
4,000	0,27	71,2	84,6
8,000	0,25	72,8	84,1
12,000	0,24	74,0	85,0
16,000	0,23	75,3	86,0
20,000	0,21	74,9	84,6
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 64,0 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 80,6 %

Tab. 21

Belastung des Knorpels Nr. 6 in Elastase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

4.4 Ergebnisse

Zunächst betrachte man die Tabellen 16 - 21. Neben der Spannungsänderung P_{sp} (N/mm^2) im Verlauf der zwanzigminütigen Belastung, wurden in Spalte drei und vier zu dem jeweiligen Zeitpunkt t (min) der prozentuale Spannungsverlust $-P_{sp}$ (%) angegeben, wobei die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2) des nicht inkubierten Knorpels zu dem Zeitpunkt t (min) die Bezugsgröße ist. Daß trotz gleicher Versuchsbedingungen und gleicher Knorpelmaße die Druckwerte der Zylinder Nr. 1 - 3 bzw. 4 - 6 untereinander differieren, läßt sich durch den unterschiedlichen Winkel, den die Schnittebene mit der Verlaufsrichtung der kollagenen Fasern und der elastischen Elemente bildet, erklären. Dennoch war bei keinem der drei in Ringerlösung inkubierten Knorpel weder nach zwanzig noch nach vierzig Stunden ein durchschnittlicher Druckverlust $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) oberhalb von 48 % vorhanden. Bei dem dritten Knorpel (Tab. 18) betrug er lediglich nur 15 %.

Ganz andere Werte ergaben sich bei Belastung der Knorpel unter Elastaseeinwirkung (Tab. 19 - 21). Abweichungen von durchschnittlich 50 % bis sogar 86,8 % von den jeweiligen Bezugsgrößen bilden einen deutlichen Kontrast zu den vorherigen Angaben (s. Abb. 9).

4.5 Interpretation

Wenn man davon ausgeht, daß der Knorpel zwar ein hochelastisches und nachgiebiges Gewebe ist, dieser jedoch nicht dem Hookeschen Gesetz (MOW, 1977) unterliegt und daß ferner wegen der mangelhaften nutritiven Verhältnisse in vitro unter ständiger Belastung degenerative Prozesse stattfinden, so kann aufgrund der ermittelten Werte angenommen werden, daß der Knorpel durch die Ringerlösung unbeeinflußt bleibt und sich diese somit als Vergleichslösung eignet. Der Elastase muß jedoch als nicht knorpelspezifisches Enzym ein Wirkungsmechanismus zugrunde liegen, der den Ablauf degenerativer Prozesse massiv beschleunigt.

Eingangs wurde erwähnt, daß die neutralen Aminosäuren bevorzugter Angriffspunkt dieses Fermentes sind. Setzt man ferner voraus, daß die meisten Mucopolysaccharide durch einen Serin- oder Threoninrest an ein spezifisches Protein gebunden sind (BUDDECKE, 1977), so wären gerade diese Bindungsstellen optimale Angriffspunkte für die Elastase (MENNINGER, 1979).

5. Die Wirkung von Hyaluronidase auf den hyalinen Knorpel

5.1 Hyaluronidase

In aufwendigen Untersuchungsverfahren hatten Autoren schon vor 1950 das Enzym in einer Anzahl von Bakterien wie z.B. in Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken und Clostridien in geringer Menge nachgewiesen. Während man damals noch nicht exakt erkannt hatte, wie substratspezifisch Hyaluronidase nun war, haben neuere Ergebnisse bewiesen, daß das Ferment innerhalb der Polysaccharidkette ß-N-acetylgalaktosaminidische bzw. ß-N-acetylglucosaminidische Bindungen hydrolysiert und nur Chondroitin-4- bzw. Chondroitin-6-sulfat und Hyaluronat angreift. Den höchsten Gehalt an Hyaluronidase findet man in den Testikel und im Sperma vieler Säugetierarten. Das Enzym tritt gleichzeitig mit den ersten Spermatocyten auf, erreicht aber seinen Höhepunkt schon vor Bildung reifer Spermatozoen (GIBIAN, 1960).

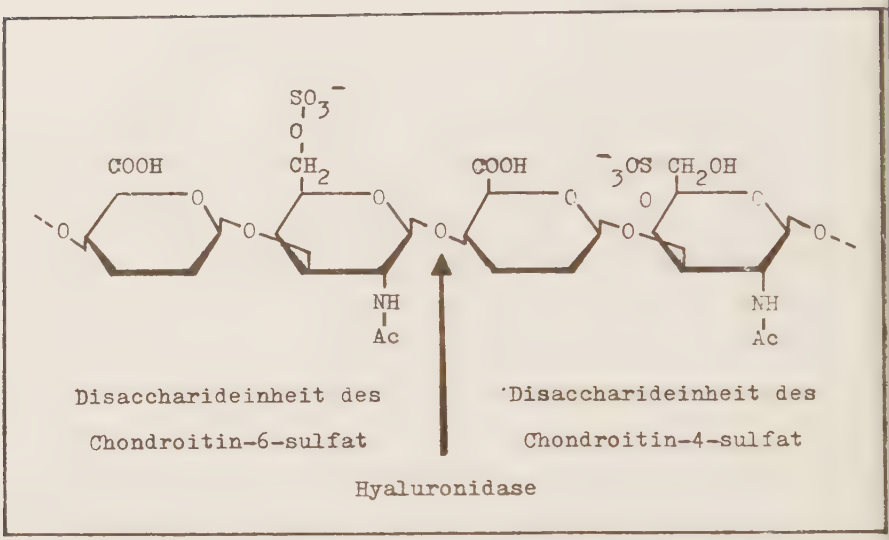

Abb. 10

Schema des Abbaus einer Polysaccharidkette durch das Enzym Hyaluronidase

5.2 Präparation der Enzymlösung

In etlichen Vorversuchen hat es sich gezeigt, daß das Enzym Hyaluronidase, gewonnen aus Stiertestes, bei einem pH Wert von ca. 6,5 und einer Temperatur von 37°C ein günstiges Wirkungsspektrum hatte. Das Temperaturoptimum des Fermentes liegt zwar bei 50°C, doch würde bei dieser unphysiologisch hohen Temperatur der Knorpel schon vor Belastung irreversibel geschädigt.

Als Puffer hat sich wiederum eine Lösung aus Rinderserumalbumin und Dinatriumhydrogenphosphat bzw. Natriumdihydrogenphosphat bewährt. Größter Wert wurde auf die Puffer-Enzymemulsion gelegt, da schon durch geringe Erschütterungen die sehr empfindliche Hyaluronidase irreversibel denaturiert wird.

5.3 Mechanische Vorgeschichte des Knorpels und Versuchsablauf

Keine Veränderung gegenüber 4.3

Nachdem die sechs Knorpelzylinder zwanzig Minuten lang in Ringerlösung rhythmisch komprimiert worden waren, wurden sie nach zwanzigstündiger Inkubation in Ringerlösung einer erneuten zwanzigminütigen Belastung ausgesetzt. Nach anschließender zwanzigstündiger Inkubation der ersten drei Knorpelzylinder und siebzigstündiger Inkubation der restlichen drei in Hyaluronidase beendete eine dritte Belastung von ebenfalls zwanzig Minuten die Versuchsreihe (s. Abb. 11).

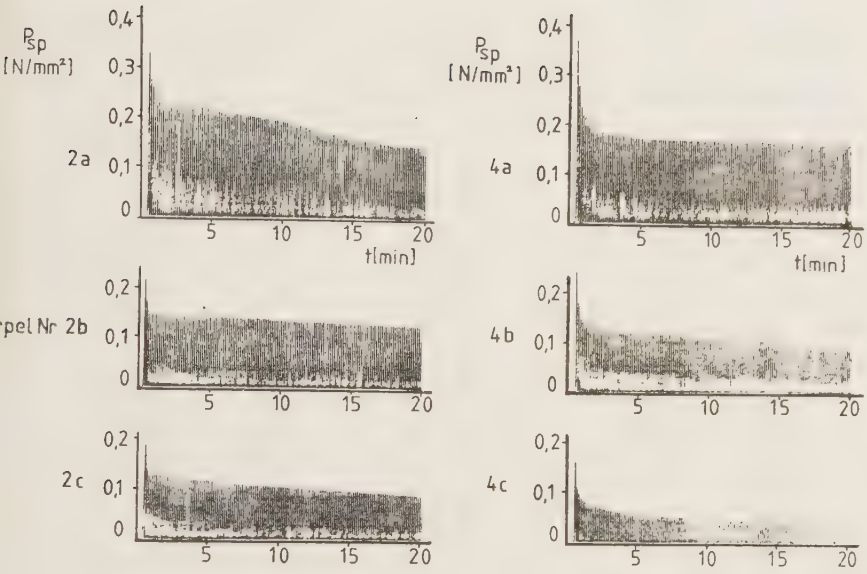

Abb. 11

Kompressionsdiagramme der präformierten Knorpelzylinder Nr. 2 und 4.

2a: Belastung des Knorpel Nr. 2 in Ringerlösung 20 min lang

2b: Belastung des Knorpel Nr. 2 nach 20 Std. Inkubation in Ringerlösung 20 min lang

2c: Belastung des Knorpel Nr. 5 nach 20 Std. Inkubation in Hyaluronidaselösung 20 min lang

4a: Belastung des Knorpel Nr. 4 in Ringerlösung 20 min lang

4b: Belastung des Knorpel Nr. 4 nach 20 Std. Inkubation in Ringerlösung 20 min lang

4c: Belastung des Knorpel Nr. 4 nach 70 Std. Inkubation in Hyaluronidase 20 min lang

Knorpel Nr. 1

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,47	23,0	30,6
0,250	0,38	20,6	31,1
0,375	0,37	25,1	34,1
0,500	0,35	24,6	35,5
0,750	0,34	24,4	35,8
1,000	0,33	24,1	34,3
2,000	0,32	24,4	36,7
4,000	0,31	24,3	37,3
8,000	0,27	19,9	31,2
12,000	0,25	24,8	29,3
16,000	0,19	18,3	11,7
20,000	0,14	21,7	16,5
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 22,9 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 30,2 %

Tab. 22

Belastung des Knorpels Nr. 1 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 2

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,36	39,8	44,1
0,250	0,29	39,2	46,8
0,375	0,28	38,2	48,1
0,500	0,26	39,0	48,3
0,750	0,25	39,1	45,5
1,000	0,24	37,6	45,0
2,000	0,24	38,5	46,9
4,000	0,22	34,9	44,1
8,000	0,21	33,0	46,8
12,000	0,18	24,1	42,9
16,000	0,16	17,5	38,5
20,000	0,15	15,1	40,4
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 33,0 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 44,8 %

Tab. 23

Belastung des Knorpels Nr. 2 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 3

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,42	7,3	42,0
0,250	0,35	8,6	39,3
0,375	0,32	5,7	37,8
0,500	0,31	6,2	37,3
0,750	0,30	8,3	37,4
1,000	0,30	11,3	38,1
2,000	0,30	15,7	39,6
4,000	0,29	15,2	39,8
8,000	0,28	16,1	41,7
12,000	0,28	20,1	44,1
16,000	0,28	20,9	47,3
20,000	0,28	22,6	48,9
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 13,2 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 41,1 %

Tab. 24

Belastung des Knorpels Nr. 3 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t(min).

Knorpel Nr. 4

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 70 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,38	29,4	55,9
0,250	0,28	29,7	59,3
0,375	0,25	32,0	59,8
0,500	0,23	31,0	59,2
0,750	0,31	29,8	59,5
1,000	0,21	32,0	60,4
2,000	0,19	29,4	63,6
4,000	0,18	29,3	66,5
8,000	0,17	31,7	68,4
12,000	0,17	35,5	71,1
16,000	0,17	39,5	72,4
20,000	0,17	42,1	72,4
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 32,6 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 64,0 %

Tab. 25

Belastung des Knorpels Nr. 4 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 5

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 70 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,38	16,5	45,9
0,250	0,27	16,4	45,4
0,375	0,25	20,4	48,1
0,500	0,23	18,3	47,6
0,750	0,22	22,8	49,2
1,000	0,21	20,1	48,8
2,000	0,19	16,5	50,6
4,000	0,18	15,5	53,8
8,000	0,17	16,5	59,3
12,000	0,17	25,1	61,8
16,000	0,17	33,0	64,6
20,000	0,17	36,8	65,8
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 21,5 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 53,4 %

Tab. 26

Belastung des Knorpels Nr. 5 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t(min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

Knorpel Nr. 6

Zeit t (min)	P_{sp} (N/mm^2)	$-P_{sp}$ nach 20 Std. in Ringerlösung (%)	$-P_{sp}$ nach 70 Std. in Hyaluronidase (%)
0,125	0,33	32,2	45,1
0,250	0,23	21,3	39,8
0,375	0,21	19,1	40,4
0,500	0,19	14,0	37,6
0,750	0,18	14,3	37,9
1,000	0,18	15,5	40,3
2,000	0,17	10,5	44,8
4,000	0,16	6,4	46,8
8,000	0,15	6,0	49,3
12,000	0,14	5,7	49,0
16,000	0,13	7,1	46,7
20,000	0,11	1,6	37,0
		$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 12,8 %	$\bar{x}_{-P_{sp}}$ = 42,9 %

Tab. 27

Belastung des Knorpels Nr. 6 in Ringerlösung und Hyaluronidase; dabei bedeuten: t (min) = Belastungszeitraum; P_{sp} (N/mm^2) = Druckspannung der Probestücke zur Zeit t (min); $-P_{sp}$ (%) = prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min) bezogen auf die Druckspannung P_{sp} (N/mm^2), die der Knorpel unter Belastung in Ringerlösung vor der Inkubation zeigte; $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (%) = mittlerer prozentualer Spannungsrückgang zur Zeit t (min).

5.4 Ergebnisse

Die Werte in Spalte drei und vier der Tabellen 22 - 27 stellen den prozentualen Spannungsrückgang $-P_{sp}$ (%) zu dem jeweiligen Zeitpunkt t (min) dar, wobei die zu dem bestimmten Zeitpunkt t entsprechende Druckspannung P_{sp} (N/mm^2) wiederum die Bezugsgröße ist. Trotz gleicher Inkubationsdauer der Knorpel Nr. 1 - 3, weichen die mittleren prozentualen Spannungsverlustwerte $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (Ringer) und $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (Hyaluronidase) voneinander teilweise sogar erheblich ab (s. Tab. 24).

Bei siebzigstündiger Inkubation in Hyaluronidaselösung ergibt sich gegenüber einer zwanzigstündigen Inkubation in Ringerlösung bei Knorpel 4 - 6 eine noch größere Differenz hinsichtlich der mittleren prozentualen Spannungsverluste $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (Ringer) und $\bar{x}_{-P_{sp}}$ (Hyaluronidase).

Es wäre freilich nicht ganz richtig anzunehmen, rechnerisch einen Proportionalitätsfaktor bestimmen zu können, um dann von vornherein eine qualitative und quantitative Aussage über die fraktionierte zeitliche Abhängigkeit hinsichtlich der einzelnen Knorpeldegenerationsstufen unter Hyaluronidaseeinwirkung machen zu können, und zwar aus folgenden drei Gründen:

1. Der Knorpel ist in seiner Ultrastruktur nicht überall identisch; so sind z.B. die oberflächlich gelegenen Knorpelschichten anders strukturiert als die tieferen.

2. Die Enzymaktivität ändert sich mit der Zeit, und Artefakte während der Enzymzubereitung können ebenfalls nicht immer ausgeschlossen werden.

3. Die Begrenzung der Meßgenauigkeit der Versuchsapparatur ist zu berücksichtigen.

Dennoch läßt sich mit Sicherheit behaupten, daß durch die Einwirkung von Hyaluronidase auf den hyalinen Knorpel eine Degeneration stattfindet, die sich in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer mehr oder weniger intensiv in einem Kraftrückgang verdeutlicht.

5.5 Interpretation

Obwohl die Testeshyaluronidase offenbar nicht identisch mit der Gewebshyaluronidase ist, so hat auch sie eine gewisse degenerative Wirkung auf den hyalinen Knorpel. Dabei erhebt sich die Frage, woher genau dieser Kraftverlust (s. Abb. 11) rührt. An dieser Stelle sei noch einmal auf die Funktion der Mucopolysaccharide eingegangen.

Als Interzellularsubstanz sind sie für die mechanischen Eigenschaften nicht nur des Knorpels, sondern des gesamten Binde- und Stützgewebeapparates mit verantwortlich. Einerseits gewährleisten sie die elastischen Eigenschaften der fibrillären Elemente, andererseits schützen sie die einzelnen Mikrofibrillen vor der Zerstörung durch Säuren oder Kollagenasen. Eine weiter wesentliche Funktion liegt in ihrer Bedeutung als histologische Membran, die quasi einer Barriere einmal den Stoffwechsel reguliert und zusätzlich die Invasion pathogener Keime verhindert. Nicht zuletzt vermögen die Mucopolysaccharide das Interzellularwasser (ca. 75 % des gesamten Körpergewichts) zu binden und die Gewebedurchflutung zu bremsen. Auf die spezielle Aufgabe der Hyaluronsäure als Gleitmittel der Synovialflüssigkeit wird später noch eingegangen.

Wie schon oben erwähnt, besteht die Wirkung von Testeshyaluronidase in der Eröffnung beschriebener glykosidischer

Bindungen. Durch die bruchstückhaften Oligosaccharide als Teilprodukte der Depolymerisation, wird die Permeabilität im Sinne einer Verstärkung beeinflußt, so daß die ursprüngliche Kontrollerfunktion der unversehrten Mucopolysaccharide bezüglich der Stoffaustauschregulation und der Keiminvasion stark reduziert wird.

Schon 1929 prägte Durau-Reynals den Begriff "spreading factor" womit er eine zwei- bis dreidimensional gesteigerte Diffusibilität eines Substrates unter Hyaluronidasewirkung meinte (GIBIAN, 1960). In einigen Versuchsreihen von HARDINGHAM, MUIR et al., zeigte sich nach Einwirkung testikulärer Hyaluronidase auf extrahierte Hyaluronsäure eine drastische Viscositätsverminderung. KEMPSON (1975) zeigte ebenfalls, indem er Kathepsin D auf die Proteoglykane einwirken ließ, daß mit Abnahme des Glycosaminoglykangehaltes eines Knorpels seine Permeabilität steigt.

So ist es zu erklären, daß der Knorpel aufgrund seiner gesteigerten Permeabilität, seiner mangelnden Wasserbindungsfähigkeit und seiner verminderten Stabilität als Folge der Depolymerisation der sauren Mucopolysaccharide nach Hyaluronidaseeinwirkung auf Belastung mit einem Kraftrückgang bzw. einem Druckspannungsverlust reagiert.

6. Diskussion

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, wie verschiedene Enzyme und Mineralien Einfluß nehmen auf das mechanische Verhalten des hyalinen Knorpels. Unter der Wirkung verschiedener Natriumchloridlösungen zeigte das Untersuchungsgut bei Konzentrationswechsel kein lineares Verhalten bezüglich seiner Spannungsänderung. Eine Konzentrationserhöhung oder -erniedrigung vermochte der Knorpel im physiologischen Bereich am besten zu kompensieren; daß die Versuchsproben und der Knorpel in toto trotz gleicher Normierung und gleichen Standortes verschieden strukturiert sind (BARGMANN, 1977) kam in der relativ hohen Varianz und Streuung zum Ausdruck. Die Hystereseschleifen verdeutlichen einmal, daß der Knorpel bei der Be- und Entlastung nicht dem Hookeschen Gesetz folgt, sondern daß beim Hin- und Rückweg verschiedene Kurven durchlaufen werden; zum anderen waren ihre Flächeninhalte ein Maß für das Verhältnis Viscosität : Elastizität; d.h. je größer die Fläche, desto mehr überwiegt die viscöse Komponente z.B. unter Einfluß 0,3%iger NaCl-Lösung.

Die folgenden Versuche verdeutlichen, daß lediglich Calcium in ionisierter Form einen Spannungsverlust am belasteten hyalinen Knorpel verursacht, nicht aber an Gluconat gebundenes Calcium. Aufgrund der besonders hohen Bindungskapazität von Chondroitinsulfat für Calciumionen, wirkte

sich eine Elektrolytlösung nur geringer Konzentration erheblich auf die Kraft aus. So war im closed-loop-Versuch zu sehen, wie enorm der Weg ansteigen mußte, um die Spannung im Knorpel konstant zu halten. Die verzögerte Adaption des Kraftrückgewinns im Gegensatz zur Relaxation nach Milieuänderung kam im 4. Teilversuch klar zum Ausdruck. Während Elektrolylösungen niedriger Konzentration durch Ladungsausgleich eine Zustandsänderung der extrazellulären Aggregate bewirken, führen höhere Konzentrationen zu einer Proteoglycanextraktion.

Beides zeigte sich in einem mehr oder weniger ausgeprägten Spannungsverlust des Untersuchungsgutes unter Belastungen. Ganz anders ist das Wirkungsspektrum der Enzyme. Proportional zur Inkubationszeit sinkt die Spannung des rhythmisch belasteten hyalinen Knorpels unter dem Einfluß von Hyaluronidase und Elastase. Durch Hyaluronidase, die glykosidische Bindungen der Glykosaminoglykane spaltet, wird der Gesamtgehalt der Mucopolysaccharide herabgesetzt. Die Schrankenfunktion geht verloren und die gesteigerte Wasserpermeabilität und Diffusibilität bewirken einen Kraftrückgang. Die Elastase bevorzugt die neutralen Aminosäuren als Angriffsobjekt. Die Abspaltung der Mucopolysaccharide vom Trägerprotein dürfte ebenfalls Ursache für eine gesteigerte Flüssigkeitsfluktuation sein. Während die Proteinkomponente von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat oder Heparin 10 - 20 % beträgt und der Polysaccharidanteil 80 - 90 %

macht der Proteingehalt der Hyaluronsäure nur 0,5 - 2 % aus.

Neben Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat kommt der Hyaluronsäure eine besondere Bedeutung zu. GREGORY (1973), HARDINGHAM und MUIR (1974) und HASCALL und HEINEGARD (1974) demonstrierten, daß zwischen Hyaluronsäure und Proteoglykanen eine gewisse Wechselwirkung vorhanden ist.

Eine große Zahl Proteoglykane vermag an bestimmter Stelle eine Hyaluronsäurekette zu binden, wobei der Proteinmantel des Proteoglykans der Bindungsträger ist und ein sog. "linkage protein" als Stabilisator dieses Makroaggregates fungiert. Diese Wechselwirkung - Proteoglykan/Hyaluronsäure - führt zu einem Anstieg des hydrodynamischen Volumens, wie Viscositätsmessungen zeigten (s. Abb. 12).

In einer anderen Studie von 1973 bewiesen sie in aufwendigen Versuchsreihen, daß die unter dem Einfluß des testikulären Enzyms Hyaluronidase aus Hyaluronsäure entstandenen Oligosaccharide die Proteoglykanmoleküle von den Hyaluronsäuremolekülen kompetiv verdrängen. Ferner verdeutlichten sie, daß das Decasaccharid die kleinste Einheit ist, welches effektiv um die Hyaluronsäure-Bindungsstelle konkurrieren kann.

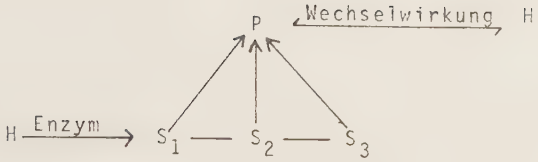

Abb. 12

P: Proteoglykan

H: Hyaluronsäure

S: entstandene Decasaccharide

Dieser Verdrängungsmechanismus kam ebenfalls in einer drastischen Viscositätsverminderung zum Ausdruck. CHRISTNER (1977), TSIGANOS, HARDINGHAM und MUIR (1972) zeigten, daß eine Carboxylgruppenveränderung der Hyaluronsäureoligosaccharide nur wenig (5 - 10 %) Einfluß nimmt auf den oben beschriebenen Verdrängungsmechanismus.

KEMPSON (1975) bewirkte ebenfalls einen enzymatischen Abbau der Glycosaminoglykane in vitro, indem er die Endopeptidasen Kathepsin D und Kathepsin B1 über einen Zeitraum von 100 h auf hyalinen Femurknorpel einwirken ließ. Die Folge war eine enorme Abnahme des "tensile stress" die er auf die gesteigerte Permeabilität der Extrazellulärflüssigkeit zurückführte. Fazit seiner Untersuchungen: Je höher der Glycosaminoglycangehalt eines Knorpels ist, desto niedriger ist die Permeabilität, desto größer ist seine Viscoelastizität. Sowohl die Hyaluronidase, die Endopeptidasen, Kathepsin G (ROUGHLEY, 1977), D und B1 und die in meinem vorgenommenen Versuch benutzte Endopeptidase Elastase haben trotz verschiedener Wirkungsmechanismen eines gemeinsam: sie erniedrigen die Viscosität und beeinflussen somit das rheologische Verhalten des Knorpels (BARRET, 1975; KOBAYASHI, 1973; OGSTON, 1970).

Mit dem Alter nimmt der Gehalt an Chondroitin-4-sulfat zugunsten des Keratansulfats ab. Ebenso sinkt der Sulfatisierungsgrad und die Kettenlänge, wodurch die Calcium-bindende

Eigenschaft verloren geht (SIEGENTHALER, 1979).
Im Vordergrund steht jedoch die schon bei Jugendlichen auftretende rheumatoide Arthritis. Im Chemogramm der Synovialflüssigkeit findet man eine Abnahme der Ca^{++} Ionenkonzentration, deren Ursache vielleicht in der Erniedrigung der Polymerisation einzelner Mucopolysaccharide zu finden ist. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch der Gehalt der Synovialflüssigkeit an Hyaluronsäure, die ihr die hohe Viscosität verleiht und die Reibung zwischen den Gelenkflächen in Grenzen hält (LEHNINGER, 1977 und HARRIS, 1971). In klinischen Tests wurde ferner festgestellt, daß die Hyaluronsäurekonzentration in der Synovialis von Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis beträchtlich erniedrigt ist. Eine Ursache dafür ist die Oberaktivität einzelner proteolytischer Enzyme, besonders aber die der Hyaluronidase (GREILING, 1974).

Beachtet man die Wirkung von Hyaluronidase und den Effekt verschiedener Elektrolytkonzentration auf den Knorpel, wie im obigen Versuch demonstriert, und dann dazu ihre Wirkung auf die Synovialis, so dürfte man wohl mit Sicherheit behaupten, daß Elektrolytverschiebungen und Enzymüberaktivität zusammengenommen den Ablauf degenerativer Gelenkerkrankungen massiv beschleunigen (HARTMANN und DEICHER, 1973; HARTMANN, 1974).

7. Anhang

7.1 Symbole, Bezeichnungen und Definitionen

$D = 2r$ (mm)	= Ausgangsdurchmesser, ursprünglicher Durchmesser
h = (mm)	= Anfangshöhe des Knorpelzylinders im unbelasteten Zustand
P = (N)	= auf die Probe wirkende Kraft
P_{sp} = (N/mm^2)	= Druckspannung der Probezylinder unter Belastung
P_{sp} = (%)	= prozentuale Abweichung der Druckspannung von der Ausgangsdruckspannung P_{sp} (N/mm^2) unter Belastung
A = (mm^2)	= Flächeninhalt der wegbegrenzten Hystereseschleifen
t = (min, sec)	= Zeit
v_t = (mm/min)	= Registrierpapiervorschubgeschwindigkeit

7.2 Viscoelastisches Verhalten, Kriechen (creep modul), Relaxation

Stoffe nennt man viscoelastisch, wenn sich ihr Formveränderungsverhalten sowohl auf elastische als auch viscöse Anteile zurückführen läßt. In einem viscoelastischen Festkörper überlagern sich Hookesche Verformungen und Newtonsches Fließen. Die dabei im Laufe der Dauerbelastung auftretenden Zustandsänderungen sind Kriechen (Zeit- bzw. Dauerstandverformungen) und Relaxation (Entspannung).

Unter Kriechen versteht man den zeitabhängigen Verformungszuwachs unter dauernder konstanter Spannung σ_o . Die sofort aufgetretene Dehnung ε_o nimmt im Laufe der Zeit zu und strebt i.a. einem Grenzwert ε_∞ zu, der sich aus der verzögert elastischen und der verzögert bleibenden Verformung, dem viscosen Fließen, zusammensetzt. Bei Entlastung geht sofort ε_{el} und im Laufe der Zeit die verzögert elastische Dehnung ε_{vel} zurück (Rückkriechen), und es bleibt die gesamte bleibende Dehnung $\varepsilon_{bl} + \varepsilon_f$ (Setzen und Fließen) bestehen. Die Kriechverformung ε_K wird i.a. nicht als absolute Größe angegeben und für die Verformungsberechnung verwendet, sondern auf die gleichzeitig sofort auftretende elastische Verformung ε_{el} bezogen.

Diesen zeitabhängigen Quotienten nennt man die Kriechzahl :

$$t = \frac{\varepsilon_k}{\varepsilon_{el}}$$

Die spannungsabhängige Dehnung unter Dauerlast ergibt sich dann zu

$$\text{ges } \varepsilon_t = \varepsilon_{el} + \varepsilon_k = \varepsilon_{el} + \varphi_t \cdot \varepsilon_{el}$$

$$= \frac{\sigma_o}{E} (1 + \varphi_t).$$

Unter Relaxation versteht man den zeitabhängigen Spannungsabbau bei dauernder konstanter Dehnung ε_o. Die sofort erreichte Spannung σ_o wird durch die viscose Strukturänderung im Laufe der Zeit abgebaut, bis die Restspannung σ_∞ nicht mehr zum weiteren Fließen ausreicht. Der Spannungsabfall $\sigma_o - \sigma_t$ wird i.a. auf die Ausgangsspannung σ_o bezogen. Man erhält dann die Relaxationszahl ψ_t:

$$\psi_t = \frac{\sigma_o - \sigma_t}{\sigma_o} = 1 - \frac{\sigma_t}{\sigma_o}$$

Die Relaxationsfunktion strebt somit wie die Kriechfunktion einem Endwert zu. Die Restspannung σ_t ergibt sich zu

$$\sigma_t = \sigma_o - (\sigma_o - \sigma_t) = \sigma_o (1 - \psi_t).$$

Kriechen und Relaxation sind verwandte Kenngrößen, deren Werte man in erster Näherung durch die Meßwerte der jeweils anderen Kenngröße errechnen kann. So gilt also

$$\sigma_t \approx \frac{\sigma_o}{1 + \varphi_t} \quad \text{und} \quad \varphi_t \approx \frac{\sigma_o - \sigma_t}{\sigma_t} .$$

8. Literaturverzeichnis

1. ARNOLD, G.: Biomechanische Eigenschaften zug- und druckübertragender Bindegewebsstrukturen. Niedersächs. Ärzte-Bl. 45, 534-539 (1972).

2. ARNOLD, G. und C. HARTUNG: Methoden und Ergebnisse rheologischer Untersuchungen am hyalinen Knorpel. Z. Orthop. 111, 153-159 (1975).

3. ARNOLD, G.: Biomechanische und rheologische Eigenschaften menschlicher Sehnen. Z. Anat. Ent. Gesch. 143, 263-300 (1974).

4. ARNOLD, G., F. GROSS und H. FESSEL: In vitro Versuche zum mechanischen Verhalten des hyalinen Knorpels unter statischen und dynamischen Belastungen. Z. Orthop. 116, 428-429 (1978).

5. BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 7. Aufl., Seite 121, Thieme Verlag, Stuttgart 1977.

6. BARRETT, J.: Dynamics of connective tissue macromolecules. E. BURLEIGH, P.M. and A.R. POOLE, pp. 189-226, North-Holland, Amsterdam/Oxford (1975).

7. BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie. 5. Aufl., Seite 15-480, De Gruyter Verlag, Berlin/New York (1977).

8. BUDDECKE, E.: Pathobiochemie. 1. Aufl., Seite 337-339, De Gruyter Verlag, Berlin/New York (1978).

9. CAEL, J.J., W.T. WINTER and STRUTHER ARNOTT: Calcium Chondroitin 4-Sulfate: Molekular conformation and organization of polysaccharide chains in a proteoglycan. J: Mol. Biol. 125, 21-42 (1978).

10. CHRISTNER, J.E., L. MARTIN: Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. Biochem. 167, 711-716 (1977).

11. ELMORE, S.M., L. SOKOLOFF, G. NORRIS and P. CARMECI: Nature of imperfect elasticity of articular cartilage. J. appl. Physiol. 18, 393-396 (1963).

12. GIBIAN, H.: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. 1. Aufl., 4. Band, Seite 130-160. Deuticke Verlag, Wien 1959.

13. GREILING, H.: Biorheological properties and the proteohyaluronate content of synovial fluid. In: Biopolymere and Biomechanik von Bindegewebssystemen, Seite 311-316, herausg. von F. HARTMANN, Springer Verlag Berlin (1974).

14. GROSS, R.: Lehrbuch der Inneren Medizin. 5. Aufl. Seite 857-858, Schattauer Verlag, Stuttgart/New York (187

15. HARDINGHAM, T.E. and H. MUIR: Binding of oligosaccharides of hyaluronic acid to proteoglycan. Biochem. J. 135, 905-911 (1973).

16. HARDINGHAM, T.E. and H. MUIR: Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. Biochem. J. 139, 565-566 (1974).

17. HARRIS, E.D. Jrd., D.R. DI BONA and S.M. KRANE: Mechanisms of destruction of articular structures in rheumatoid arthritis. Ed. B.K. FORSCHER and J.C. HOUCK (Excerpta Medica Foundation), p. 243, Amsterdam (1971).

18. HARTMANN, F. und H. DEICHER: Bindegewebe in: Klinische Pathologie. Herausg. von W. SIEGENTHALER, Thieme Verlag, Stuttgart (1973).

19. HARTMANN, F.: Physikalische Eigenschaften von Bindegewebssystemen. In: F. HARTMANN: Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritis. Seite 40-59, Byk Gulden Pharmazeutika Konstanz (1974).

20. HARTMANN, F. und C. FRICKE: Experimentelle Beiträge zur Struktur und Funktion gesunden und kranken Bindegewebes. Z. Rheumaf. 16, 65-78 (1957).

21. HAYES, W.C.: Mechanics of human articular cartilage. Ph. D. Thesis, Northwestern University, USA 1970.

22. HAYES, W.C. and L.F. MOCKROS: Viscoelastic properties of human articular cartilage. J. appl. Physiol. 31, 562-568 (1971).

23. HILDEBRANDT, J., M. JÄGER, H.G. MOSLE, M. UNGETHOM und A.N. WITT: Reibungs- und Verschleißuntersuchungen für die Werkstoffpaarungen bei alloarthroplastischen Gelenkimplantaten. Arch. Orthop. Unfall-Chir. 72, 224-234 (1972).

24. HOFFMANN, P. and T.A. MASHBURN, Jr.: Collagen-proteoglycan interactions in bovine nasal cartilage. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, ed. by BALAZS, E.A., pp. 1179-1199. Academic Press, New York 1970.

25. IDELBERGER, K.: Lehrbuch der Orthopädie. 3. Aufl., Seite 73-77, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1978).

26. KEIDEL, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. 5. Aufl., Abschn. 1, 7, 8 Thieme Verlag, Stuttgart (1979).

27. KEMPSON, G.E., N.A.R. FREEMAN and S.A.V. SWANSON: The determination of a creep modulus for articular cartilage from identation tests on the human femoral head. J. Biomech. 4, 239-250 (1971).

28. KEMPSON, G.E.: The effects of proteoglycan and collagen degradation on the mechanical properties of adult human articular cartilage. In: Dynamics of connective tissue macromolecules, ed. by BURLEIGH, P.M.C. and A.R. POOLE, pp. 277-307. North-Holland Publishing Company, Amsterdam/Oxford 1975.

29. KEMPSON, G.E.: Mechanical properties of articular cartilage. In: Adult articular cartilage, ed. by FREEMAN, M.A.R., pp. 171-227. Pitman Medical, London 1973.

30. KOBAYASHI, T.K. and V. PEDRINI: Proteoglycan-collagen interactions in human costal cartilage. Biochim. Biophys. Acta 303, 148-160 (1973).

31. LEHNINGER, A.: Biochemie. 2. Aufl. Seite 272-274, Verlag Chemie, Weinheim (1979).

32. MAROUDAS, A., H. MUIR and J. WINGHAM: The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. Biochim. Biophys. Acta 177, 492-500 (1969).

33. MAROUDAS, A.: Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. Biophys. J. 10, 365-379 (1970).

34. MAROUDAS, A.: Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. Biorheology 12, 233-243 (1975).

35. MENNINGER, H., R. PUTZIER, W. MOHR, B. HERING and H.D. MIERAU: Role of granulocyte elastase in rheumatoid arthritis: Effect on mechanical behaviour of cartilage and identification at the cartilage/pannus junction. In: Biological functions of proteinases, ed. by H. HOLZER and H. TSCHESCHE, pp. 196-205. Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/New York 1979.

36. MORRISON, J.B.: The mechanics of the knee joint in relation to normal walking. J. Biomechanics, 3, pp. 51-61. Pergamon Press, Oxford 1970.

37. MOW, V.C., M.W. LAI and I. REDLER: Some surface characteristics of articular cartilage, Part I: A scanning electron microscopy and a theoretical model for the dynamic interaction of synovial fluid and articular cartilage. J. Biomech., 7, pp. 449-456. Pergamon Press (1977).

38. MOW, V.C., M.W. LAI., J. EISENFELD and I. REDLER: Some surface characteristics of articular cartilage, Part II: On the stability of articular surface and a possible biomechanical factor in the etiology of chondrodegeneration. J. Biomech. 7, pp. 457-468. Pergamon Press (1974).

39. MOW, V.C., J.M. MANSOUR: The nonlinear interaction between cartilage deformation and interstitial fluid flow. J. Biomech., 10, pp. 31-39. Pergamon Press (1977).

40. MUIR, H., P. BULLOUGH and A. MAROUDAS: The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. J. Bone Jt. Surg. 52B, 554-563 (1970).

41. OGSTON, A.G.: The biological function of the glycosaminoglycans. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, ed. by BALAZS, E.A., pp. 1231-1240. Academic Press, New York 1970.

42. PARSONS, J.R. and J. BLACK: The viscoelastic shear behaviour of normal rabbit articular cartilage. J. Biomech. 10, pp. 21-29 (1977).

43. PHELPS, C.F. and E.D.T. ATKINS: Implications of the tertiary structure of glycosaminoglycans and proteoglycans. In: Biopolymere and Biomechanik von Bindegewebssystemen, herausg. von F. HARTMANN, Seite 317-326. Springer Verlag, Berlin (1974).

44. POHL, R.W.: Einführung in die Physik. 2. Band, 19. Aufl., S. 106-109. Springer Verlag, Berlin/Göttingen/ Heidelberg 1962.

45. RICE. S.A. and M. NAGASAWA: Polyelektrolyte solutions. 1. Ed., Academic Press, New York (1961).

46. ROUGHLEY, P.J. and A.J. BARRETT: The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Biochem. J. 629-637 (1977).

47. SIEGENTHALER, W.: Pathophysiologie. 4. Aufl., Seite 954-960. Thieme Verlag, Stuttgart (1979).

48. SOKOLOFF, L.: Elasticity of articular cartilage. In: Effect of ions and viscous solutions. American Association for the Advancement of Science, 141, No 3585, 1055-1057 (1963).

49. SOKOLOFF, L.: Elasticity of ageing cartilage. Fed. Proc. 25, 1089-1095 (1966).

50. SOKOLOFF, L.: The biology of degenerative joint disease. University of Chicago Press. Chicago/London (1969).

51. SOKOLOFF, L.: Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. Arth. Rheum. 8, 481-494 (1965).

52. STANLEY, M.E., L. SOKOLOFF, G. NORRIS and P. CARMECI: Nature of "imperfect" elasticity of articular cartilage. Journal of Applied Physiology, 18, 393-396 (1963).

53. TORZILLI, P.A. and VAN C. MOW: On the fundamental fluid transport mechanisms through normal and pathological articular cartilage during function-1 the formulation. J. Biomech. 9, 541-552 (1976).

54. TRAUTWEIN, A.: Physik für Mediziner. 2. Aufl., Seite 99-102. De Gruyter Verlag, Berlin/New York 1978.

55. TSIGANOS, C.P., T.E. HARDINGHAM and H. MUIR: Aggregation of cartilage proteoglycans. Biochem. J. 128, 121-122 (1972).

56. WALDEYER, A.: Das Knorpelgewebe. In: Anatomie des Menschen. 13. Aufl., 1. Band, Seite 26-29. De Gruyter Verlag, Berlin/New York 1976.

57. WALKER, P.S. and I.V. HAJEK: The load-bearing area in the knee joint. J. Biomech. 5, 581-589 (1972).

58. WEGNER, W.: Zur Biorheologie des Epiphysen- und Gelenkknorpels bei Tieren. Dtsch. tierärztl. Wschr. 9, 205-209 (1974).

59. WOO, S.L.Y., W.H. AKESON and G.F. JEMMOTT: Measurements of nonhomogeneous, directional mechanical properties of articular cartilage in tension. J. Biomech. 9, 785-791 (1976).

60. ZAREK, J.M. and J. EDWARDS: Dynamic considerations of the human skeletal system. In: Biomechanics and related bio-engineering topics, ed. by KENNEDI, R.M., pp. 187-203. Pergamon Press, Oxford 1965.

Die vorliegende Arbeit entstand am Anatomischen Institut, Lehrstuhl IV, der Universität Düsseldorf mit Unterstützung der Stiftung Volkswagenwerk.

Für die Oberlassung des Themas, für die Hilfe und wertvollen Anregungen, die zur Durchführung dieser Arbeit wesentlich beitrugen, bedanke ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. med. G. Arnold.

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. S. Hollmann für seine Hilfsbereitschaft und Besprechung der vorliegenden Arbeit. Ebenfalls danke ich Herrn Professor Dr. med. G. Arnold (Direktor des Institutes für Experimentelle Chirurgie in Düsseldorf) für die Oberlassung des Untersuchungsgutes.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Frau Ursula Hupe, geb. Büchte, für ihre Unterstützung bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Geboren	:	30.5.1951 in Recklinghausen
Eltern	:	Dr. med. Ewald Hupe und Ehefrau Liselotte
Geschwister	:	ein Bruder und zwei Schwestern
1957 - 1962	:	Grundschule in Recklinghausen
1962 - 1972	:	Gymnasium Petrinum in Recklinghausen, Abschluß mit Abitur
16.5.1972 - 31.3.1973	:	Praktikum und Krankenpflegedienst im Elisabethkrankenhaus Recklinghausen
1.4.1973 - 30.6.1974	:	Bundeswehrdienst
WS 1974 - SS 1975	:	Geologiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
WS 1975 - SS 1981	:	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf

DER DRUCKER - (Alte) Buscheystraße 138 - 4630 Bochum-Querenburg